



**Catarina Isabel
Vicente Ramos**

**Espectrometria de Massa de Macrociclos e dos seus
Aductos com o ADN**



**Catarina Isabel
Vicente Ramos**

Espectrometria de Massa de Macrociclos e dos seus Aductos com o ADN

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria da Graça Ornelas Santana Marques, Professora Associada do Departamento Química da Universidade de Aveiro e do Professor Doutor António José Venâncio Ferrer Correia, Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Apoio financeiro da FCT e do
POPH/FSE no âmbito do III Quadro
Comunitário de Apoio.



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Social Europeu

Aos meus filhos Carolina e Duarte.

Aos meus pais pelo contínuo apoio e incentivo.

o júri

presidente

Prof. Doutor Nelson Fernando Pacheco da Rocha

professor catedrático da S. A. Ciências da Saúde da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria Helena Ferreira da Silva Florêncio

professora catedrática do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Prof. Doutor António José Venâncio Ferrer Correia

professor catedrático aposentado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria da Graça Pinho Morgado da Silva Neves

professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria da Graça Ornelas Santana Marques

professora associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Carlos Manuel Ferreira de Sousa Borges

professor auxiliar do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Prof. Doutora Maria Tereza Neves Fernandez

professora auxiliar aposentada do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

agradecimentos

Agradeço à Doutora Graça Marques pela competência com que orientou o meu trabalho, transmitindo-me os mais úteis ensinamentos com paciência e lucidez. Pelo apoio e partilha do seu saber, que muito contribuíram para o meu crescimento académico e pessoal, além do estímulo que sempre me deu quando as condições me foram algo adversas. Pela sua crítica construtiva e atempada, além da sua amizade e dedicação. Sem tudo isto este trabalho não teria sido possível.

Ao Doutor Ferrer Correia pela sua insubstituível participação neste projecto e por todos os ensinamentos transmitidos no seu decorrer. O seu vasto e reconhecido saber na área da Espectrometria de Massa em muito contribuiu para o sucesso alcançado.

À Doutora Graça Neves pela disponibilidade sempre demonstrada.

À Cristina Barros por todas as valiosas sugestões que me deu para ultrapassar alguns problemas técnicos e científicos no decorrer de toda a parte experimental e pela sua amizade e apoio.

À Cláudia Simões pela sua preciosa ajuda e permanente disponibilidade o que muito facilitou a concretização deste trabalho e ao Renato Alves pela valiosa ajuda “informática” que me deu todas as vezes (e foram muitas) que necessitei, a ambos pela amizade.

Ao João Tomé pelas porfirinas cedidas e por todas as conversas construtivas que tivemos.

Ao Nuno por estar sempre ao meu lado, mesmo quando a distância foi maior.

Aos meus amigos, especialmente ao Pedro e à Sheila pelo apoio e encorajamento. Às “Massinhas” por todos os momentos de alegria e boa disposição que me proporcionaram.

Aos membros do grupo de Espectrometria de Massa do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, pelo acolhimento e colaboração.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia, pela bolsa de doutoramento concedida e subsídios atribuídos para a participação em congressos internacionais.

A todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram na realização deste trabalho o meu profundo e reconhecido agradecimento.

palavras-chave

Aductos não-covalentes, porfirinas, oligonucleotídeos, electrospray, espectrometria de massa

resumo

O trabalho de investigação desenvolvido teve como objectivo o estudo por espectrometria de massa com ionização por electrospray de compostos tetrapirrólicos (porfirinas e corróis) e das suas interações com G-quadruplexes (estruturas de ADN de ordem superior, ricas em guanina). A química em fase gasosa de porfirinas catiónicas e neutras, e de corróis, foi investigada, tendo-se verificado a ocorrência de processos inesperados que foram objecto de um estudo aprofundado: redução das porfirinas catiónicas durante o processo global de electrospray e formação, na câmara de colisões, de aductos dos corróis com moléculas de água, ambos os processos detectados no modo de iões positivos.

A redução das porfirinas ocorre através da formação de agregados catião-anião-solvente e catião-solvente-anião e os diferentes tipos de agregados conduzem a diferentes espécies reduzidas. A formação de aductos com água, bem como de outros iões-diagnóstico, permitiu a diferenciação dos isómeros posicionais dos corróis. Este último grupo de compostos foi igualmente estudado no modo de iões negativos.

A espectrometria de massa com ionização por electrospray no modo de iões negativos foi também usada no estudo de aductos quadruplex-porfirina. Foi observada a formação de aductos do tipo $[Q + nNH_4^+ + P^{p+} - (z+n+p)H^+]^{z-}$ (Q=quadruplex, P=porfirina, p=0,1,2,3,4) para todas as porfirinas seleccionadas. A caracterização destes aductos foi efectuada através das suas decomposições induzidas por colisões.

Verificou-se que o número de cargas presente nas porfirinas é um factor muito importante na estabilidade dos aductos formados, que aumenta com o aumento do número de cargas. O tipo e tamanho dos grupos substituintes presentes na porfirina não mostraram ter uma influência significativa nos processos de fragmentação.

Os resultados obtidos apontam para uma ligação externa porfirina - G-quadruplex, com as porfirinas empilhadas nas extremidades dos quadruplexes.

keywords

Non covalent adducts, cationic porphyrins, oligonucleotides, electrospray, mass spectrometry.

abstract

The main goal of the present work was to study tetrapyrrolic compounds (porphyrins and corroles) and their interactions with G-quadruplexes (higher order DNA structures rich in guanine) by electrospray mass spectrometry. The gas-phase chemistry of porphyrins (cationic and neutral) and corroles was investigated and the occurrence of unexpected processes lead to further in-depth studies. These processes were the reduction of cationic porphyrins during the overall electrospray process and the formation, in the collision cell, of adducts of corroles with water molecules, both processes detected in the positive ion mode.

The reduction of porphyrins occurs through the formation of cation -anion -solvent and cation -solvent -anion clusters, the different types of clusters leading to different reduced species.

The formation of adducts with water, as well as other diagnostic ions allowed the differentiation of the positional isomers of corroles. The latter were also studied in the negative ion mode.

Electrospray ionization mass spectrometry, operating in the negative ion mode was also used to study quadruplex-porphyrin adducts.

The formation of the species $[Q + nNH_4^+ + P^{p+} - (z+n+p)H^+]^{z-}$ (Q=quadruplex, P=porphyrin, $p=0,1,2,3,4$) was observed for all the selected porphyrins.

The characterization of these adducts was achieved through their collision-induced decompositions. It was found that the number of charges present in the porphyrins is an important factor in the stability of the adducts formed, which increases with the increase in the number of charges. The type and size of the substituent groups present in the porphyrins showed no significant influence in the fragmentation process.

The results point to adduct formation by external binding of the porphyrins, the porphyrins being stacked at the ends of the quadruplexes.

*“Só sabemos com exactidão, quando sabemos pouco; à medida
que vamos adquirindo conhecimentos, instala-se a dúvida.”*

Goethe (Alemanha, 1749 - 1832)

Índice

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	XIII
PREFÁCIO	XV

CAPÍTULO 1.

INTRODUÇÃO À ESPECTROMETRIA DE MASSA	17
1.1 - Considerações gerais	19
1.2 - Breve perspectiva histórica	21
1.3 - Espectrómetros de massa: estrutura básica e componentes	25
1.4 - Métodos de ionização	27
1.4.1 - Ionização por Electrospray	27
1.4.2 - Ionização por MALD	31
1.4.3 - Electrospray e MALDI na análise de aductos não-covalentes	33
1.5 - Analisadores	35
1.5.1 - Quadrupolo - Q	36
1.5.2 - Tempo de voo - ToF	36
1.5.3 - Trapa de iões - Ion Trap	38
1.6 - Detectores	40
1.6.1 - Multiplicador de microcanais - MCP	40
1.7 - Espectrometria de massa de multi-estágios (MSⁿ)	42
Bibliografia	43

CAPÍTULO 2.

ASPECTOS SINGULARES DA QUÍMICA EM FASE GASOSA DE PORFIRINAS CATIÓNICAS	47
2.1 - Introdução	49
2.1.1 - Considerações gerais	49
2.1.2 - Propriedades físicas e químicas	54
2.1.3 - Preparação, reactividade e aplicações	55
2.2 - Redução de porfirinas catiónicas não-metaladas	58

2.2A - meso-tris(<i>N</i>-metilpiridil)porfirinas	61
2.2A.1 - Estudos usando metanol como solvente	61
2.2A.1.1 - Espectros de massa	61
2.2A.1.2 - Espectros de iões-produto (MS/MS)	66
2.2A.2 - Estudos com outros solventes	76
2.2A.2.1 - Espectros de massa	76
2.2A.2.2 - Espectros de iões-produto	77
2.2B - meso-tetraquis(<i>N</i>-alquilpiridil)porfirinas	81
2.2B.1 - Espectros de massa	82
2.2B.1.1 - <i>N</i> -alquilpiridilporfirinas	82
2.2B.1.2 - 5,10,15,20-tetraquis(4-trimetilamoniofenil)porfirina	84
2.2B.2 - Espectros de iões-produto (MS/MS)	87
2.2B.2.1 - <i>N</i> -alquilpiridilporfirinas (porfirinas 14 a 17)	87
2.2B.2.2 - 5,10,15,20-tetraquis(4-trimetilamoniofenil)porfirina	89
2.3 - Conclusões	93
2.4 - Parte Experimental	94
Bibliografia	96

CAPÍTULO 3.

ISÓMEROS DE AMINOMETILCORRÓIS: CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA	103
3.1 - Introdução	105
3.1.1 - Considerações gerais	105
3.1.2 - Propriedades físicas e químicas	107
3.1.3 - Preparação, reactividade e aplicações	108
3.2 - Caracterização por espectrometria de massa de isómeros de aminometilcorróis com comportamento invulgar em fase gasosa	110
3.2.1 - Estudos no modo de iões positivos	112
3.2.1.1 – Espectros de massa	112
3.2.1.2 - Espectros de iões-produto	115
3.2.1.3 - Curvas de decaimento	118
3.2.1.4 - Mecanismos de fragmentação	121
3.2.1.5 - Mecanismos de formação dos aductos com água	123
3.2.1.6 - Cálculos semi-empíricos	123
3.2.2 - Estudos no modo de iões negativos	126
3.2.2.1 - Espectros de massa	126
3.2.2.2 - Espectros de iões-produto	127

3.3 - Conclusões	130
3.4 - Parte Experimental	131
3.5 - Cálculos teóricos para estruturas modelo	132
Bibliografia	133

CAPÍTULO 4.

ADN: CONSTITUINTES E ESTRUTURAS	139
4.1 - Os ácidos nucleicos	141
4.2 - A dupla hélice	144
4.3 - Estruturas de ordem superior do ADN	149
4.4 - Telómeros, telomerase e G-quadruplexes	152
Bibliografia	159

CAPÍTULO 5.

ESTUDO DAS INTERACÇÕES NÃO-COVALENTES DE QUADRUPLEXES E PORFIRINAS	163
5.1 - Estudo de interacções não-covalentes por espectrometria de massa	165
5.1.1 - Considerações gerais	165
5.1.2 - Interacções não-covalentes de G-quadruplexes e porfirinas	167
5.2 - Estudo das interacções não-covalentes de G-quadruplexes e porfirinas por espectrometria de massa	170
5.2A - Estudo dos aductos das porfirinas 1, 4, 9, 14 a 18 e 19 e dos quadruplexes Q1 e Q2	172
5.2A.1 - Espectros de massa	173
5.2A.2 - Espectros de iões-produto	175
5.2A.3 - Comportamento geral dos aductos	186
5.2B - Estudo dos aductos das porfirinas 2, 3, 5 a 8, 11 e 13 com os quadruplexes Q1 e Q2	187
5.2B.1 - Espectros de massa	188
5.2B.2 - Espectros de iões-produto	190
5.2B.3 - Comportamento geral dos aductos	197
5.3 - Conclusões	198

5.4 - Parte experimental: otimização de métodos e parâmetros instrumentais	201
5.4.1 - Otimização das condições experimentais no Q-ToF	202
5.4.1.1 - Preparação das amostras	202
5.4.1.2 - Otimização dos parâmetros instrumentais	209
5.4.2 - Otimização das condições operacionais na trapa de iões	210
5.5 - Procedimentos experimentais e instrumentação usada	213
5.5.1 - Estudos realizados no espectrômetro de massa Q-ToF	213
5.5.2 - Estudos realizados na trapa de iões	214
Bibliografia	215
ANEXO 1. NOMENCLATURA IUPAC, MASSAS MONOISOTÓPICAS E FÓRMULAS ELEMENTARES DAS PORFIRINAS ESTUDADAS	219
ANEXO 2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA O OLIGONUCLEOTÍDEO TG₄T (Q1)	227
ANEXO 3. TABELAS UTILIZADAS PARA PREVISÃO DE POSSÍVEIS IÕES PARA O G-QUADRUPLEX TG₄T (Q1)	230
ANEXO 4. TABELAS UTILIZADAS PARA PREVISÃO DE POSSÍVEIS IÕES PARA O G-QUADRUPLEX T₂G₅T (Q2)	239
ANEXO 5. TABELAS UTILIZADAS PARA PREVISÃO DE POSSÍVEIS IÕES PARA O G-QUADRUPLEX T₂AG₃	249
ANEXO 6. TABELAS UTILIZADAS PARA PREVISÃO DE POSSÍVEIS IÕES PARA O G-QUADRUPLEX T₄G₄T₄	261

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama do sistema desenvolvido por Thomson.....	21
Figura 2 - Espectrógrafo desenvolvido por Aston.....	22
Figura 3 - Estrutura básica de um espectrómetro de massa	26
Figura 4 - O processo de ionização por Electrospray	29
Figura 5 - Modelos propostos para formação de iões em Electrospray.....	30
Figura 6 - O processo de ionização por MALD.....	31
Figura 7 - Espectro de absorção da matriz e do analito em função do comprimento de onda do laser	32
Figura 8 - Constituintes de um analisador Q-ToF equipado com reflectrão.....	35
Figura 9 - Constituintes de um analisador do tipo quadrupolo.....	36
Figura 10 - Representação do modo de funcionamento de um reflectrão	37
Figura 11 - Diferença de resolução dos espectros obtidos com A - ToF linear e B - ToF equipado com reflectrão	38
Figura 12 - Constituintes de um analisador trapa de iões	39
Figura 13 - Exemplo de uma placa constituinte do detector MCP	40
Figura 14 - Amplificação de sinal num microcanal	41
Figura 15 - Estrutura da hematoporfirina	49
Figura 16 - Estruturas de: A - grupo heme B; B - hemoglobina	50
Figura 17 - A - estrutura da clorofila a e b; B - clorofila e cloroplastos.....	51
Figura 18 - Estruturas inicialmente propostas para as porfirinas.....	51
Figura 19 - Estruturas das primeiras porfirinas sintetizadas por Fischer	52
Figura 20 - Nomenclatura de Fischer para as porfirinas.....	52
Figura 21 - Nomenclatura IUPAC para as porfirinas.....	53
Figura 22 - Estruturas de: A - clorina; B - bacterioclorina; C - isobacterioclorina. 53	
Figura 23 - Espectro de absorção de visível típico de uma porfirina não- metalada.....	54
Figura 24 - Espectro de massa da porfirina 9	62
Figura 25 - Desconvolução dos iões $[M-H]^{2+}$ e M^{2+} para a porfirina 9	63
Figura 26 - Desconvolução dos iões M^+ e $[M+2H]^+$ para a porfirina 9	63

Figura 27 - Variação da corrente iónica de $[M+2H]^+$ em função do fluxo do introdução da amostra e da concentração	65
Figura 28 - Variação da corrente iónica de M^+ , em função do fluxo de introdução da amostra e da concentração	65
Figura 29 - Espectros de iões-produto dos iões $[M+2H]^+$	69
Figura 30 - Espectro de 1H RMN da porfirina 9	71
Figura 31 - Espectro parcial de 1H NMR de uma porfirina.....	72
Figura 32 - Espectro parcial de 1H NMR de uma mistura porfirina/clorina.....	72
Figura 33 - Espectros de absorção da porfirina 9 e da clorina	73
Figura 34 - Espectros de massa obtidos para a clorina e a porfirina 9	74
Figura 35 - Espectro de iões produto do ião M^{+} da clorina.....	75
Figura 36 - Espectro de iões produto do ião $[M+2H]^+$ da porfirina 9	75
Figura 37 - Espectro de iões-produto obtidos para a porfirina 13	77
Figura 38 - Padrões isotópicos dos iões $[M-H]^{3+}$ e $[M]^{3+}$ para a porfirina 15	82
Figura 39 - Espectros de massa obtidos para as porfirinas 15 e 18	85
Figura 40 - Espectro de iões-produto obtido para a porfirina 14	89
Figura 41 - Estrutura da cianocobalamina	105
Figura 42 - Estruturas de: A - composto I; B - estrutura final para o macrociclo final dos corróis	106
Figura 43 - Nomenclatura IUPAC para os corróis	107
Figura 44 - Espectro de massa de A - corrol 2 , B - corrol 3	112
Figura 45 - Espectro de massa parcial do corrol 3 : A - no instrumento Q-To; B - na trapa de iões.....	113
Figura 46 - Espectro de iões-produto dos iões com m/z 875.....	116
Figura 47 - Curvas de decaimento dos iões com m/z 875 formados a partir do corrol 2	118
Figura 48 - Curvas de decaimento dos iões com m/z 875 formados a partir do corrol 3	118
Figura 49 - Curvas de decaimento dos iões com m/z 920 formados a partir do corrol 2	119
Figura 50 - Curvas de decaimento dos iões com m/z 920 formados a partir do corrol 3	120

Figura 51 - Abundâncias relativas dos iões-produto dos aductos [(M-py)+H-(CH ₃) ₂ NH+H ₂ O] ⁺ , <i>m/z</i> 893, para os corróis 2 e 3	121
Figura 52 - Estruturas optimizadas dos iões com <i>m/z</i> 855	124
Figura 53 - Estruturas optimizadas dos iões com <i>m/z</i> 893	125
Figura 54 - Padrões isotópicos do ião com <i>m/z</i> 950	126
Figura 55 - Espectro de iões-produto dos aductos [M'] ⁻	127
Figura 56 - Espectro de MS ³ de A - M' → [M'-(CH ₃) ₂ N'-HF] ⁻ → iões-produto para o corrol 2 ; B - M' → [M'-(CH ₃) ₂ N'] ⁻ → iões-produto para o corrol 3	128
Figura 57 - Constituição de um nucleotídeo	141
Figura 58 - Ligações fosfodiéster entre nucleotídeos	142
Figura 59 - Estruturas químicas das bases purínicas e das bases pirimidínicas	142
Figura 60 - Francis Crick e James Watson.....	144
Figura 61 - Duas cadeias de ADN emparelhadas	145
Figura 62 - Ligações estabelecidas entre os pares A e T.....	146
Figura 63 - Ligações estabelecidas entre os pares G e C	146
Figura 64 - Estrutura de alguns intercaladores.....	148
Figura 65 - Exemplos da estrutura de A - “hairpin”; B - cruciforme ou duplo “hairpin”	149
Figura 66 - Ligações estabelecidas para formação de uma estrutura de triplex.....	150
Figura 67 - Estrutura tridimensional de um triplex	150
Figura 68 - A - Ligações estabelecidas para formação de uma estrutura de quadruplex; B - Estrutura tridimensional de um quadruplex	150
Figura 69 - Estrutura da cromatina	151
Figura 70 - Mecanismo de acção da telomerase.....	154
Figura 71 - Formação de um quarteto G em zonas ricas em guaninas.....	154
Figura 72 - Estrutura de um G-quadruplex intramolecular.....	155
Figura 73 - Topologias possíveis para os G-quadruplexes.....	156
Figura 74 - Estrutura do G-quadruplex TG ₄ T: A - forma canónica; B - forma “slipped”	157
Figura 75 - Porfirinas estudadas.....	172
Figura 76 - Espectros de massa obtidos para os quadruplexes Q1 e Q2	173

Figura 77 - Espectros de massa obtidos para A - solução de Q1; B - solução mista de Q1 e da porfirina 9	174
Figura 78 - Espectros de íões-produto dos aductos $[Q1+3NH_4^++P^{p+}-(7+p)H^+]^{4-}$ com as porfirinas 1, 14 e 18	176
Figura 79 - Abundâncias relativas dos íões-produto do espectro de íões-produto obtido a partir dos íões precursores $[Q+nNH_4^++P^{p+}-(z+n+p)H^+]^{z-}$ para as porfirinas 19, 1, 4, 9 e 14	177
Figura 80 - Abundâncias relativas normalizadas dos íões-produto e precursor obtidos no espectro de íões-produto dos íões precursores $[Q2+4NH_4^++P^{p+}-(9+p)H^+]^{5-}$ para as porfirinas 19, 1, 4, 9 e 14	177
Figura 81 - Abundâncias relativas do espectro de íões-produto obtido a partir dos íões precursores $[Q+nNH_4^++P^{4+}-(z+n+4)H^+]^{z-}$ com as porfirinas 14 a 18	179
Figura 82 - Espectros de íões-produto dos aductos $[Q2+4NH_4^++P^{4+}-14H^+]^{6-}$ com as porfirina 15 e 16	180
Figura 83 - Espectros de íões-produto obtidos para o aducto $[Q1+3NH_4^++P^{4+}-12H^+]^{5-}$ com as porfirinas 14 a 18	181
Figura 84 - Espectros de íões-produto dos aductos $[Q1+3NH_4^++9-11H^+]^{5-}$ e $[Q2+4NH_4^++9-13H^+]^{6-}$	182
Figura 85 - Espectros de íões-produto dos aductos $[Q1+3NH_4^++P^{p+}-(8+p)H^+]^{5-}$ com as porfirinas 4 e 19	183
Figura 86 - Abundâncias relativas normalizadas dos íões-produto do precursor $[Q1+3NH_4^++P^{p+}-(8+p)H^+]^{5-}$ com as porfirinas 1, 4, 9, 14 e 19	184
Figura 87 - Abundâncias relativas dos íões-produto do espectro de íões-produto obtidos a partir dos íões precursores $[Q1+3NH_4^++P^{4+}-12H^+]^{5-}$ e $[Q2+4NH_4^++P^{4+}-14H^+]^{6-}$ com a porfirina 14	185
Figura 88 - Porfirinas estudadas.....	187
Figura 89 - Espectros de massa das soluções de Q2 com as porfirinas 2 e 11 .	188
Figura 90 - Espectros de massa das soluções de Q1 com as porfirinas 7 e 8 ...	189
Figura 91 - Abundâncias relativas normalizadas em relação ao somatório das abundâncias de todos os aductos para as porfirinas 5, 6 e 11	189
Figura 92 - Abundâncias relativas normalizadas em relação ao somatório das abundâncias de todos os aductos para as porfirinas 7, 8 e 13	190

Figura 93 - Espectros de íões-produto dos aductos de Q2 com as porfirinas 2, 5, 6 e 11.....	191
Figura 94 - Espectros de íões-produto dos aductos de Q1 com as porfirinas 5 a 8.....	192
Figura 95 - Abundâncias relativas normalizadas dos íões-produto dos aductos $[Q1+3NH_4^++P^{2+}-9H^+]^{4-}$ e $[Q2+4NH_4^++P^{2+}-11H^+]^{5-}$ com as porfirinas 5 a 8.....	193
Figura 96 - Abundâncias relativas normalizadas dos íões-produto dos aductos $[Q1+3NH_4^++P^{3+}-10H^+]^{4-}$ e $[Q2+4NH_4^++P^{3+}-12H^+]^{5-}$ com as porfirinas 11 e 13	193
Figura 97 - Espectros de íões-produto dos aductos $[Q2+4NH_4^++P^{p+}-(10+p)H^+]^{6-}$ com as porfirinas 2, 5, 6 e 11	194
Figura 98 - Abundâncias relativas normalizadas dos íões-produto dos aductos $[Q1+3NH_4^++P^{p+}-(8+p)H^+]^{5-}$ com as porfirinas 3, 7, 8 e 13.....	195
Figura 99 - Abundâncias relativas normalizadas dos íões-produto dos aductos $[Q1+3NH_4^++P^+-9H^+]^{5-}$ e $[Q2+4NH_4^++P^+-11H^+]^{6-}$ com as porfirinas 2 e 3.....	196
Figura 100 - Abundâncias relativas normalizadas dos íões-produto dos aductos $[Q1+3NH_4^++P^{3+}-11H^+]^{5-}$ e $[Q2+4NH_4^++P^{3+}-13H^+]^{6-}$ com as porfirinas 11 e 13	196
Figura 101 - Espectros de massa de: A - solução de quadruplex obtida após tratamento com resina; B - solução de quadruplex analisada directamente .	204
Figura 102 - Espectros de massa de: A - solução do novo oligonucleotídeo; B - solução de quadruplex obtida após tratamento com resina.....	205
Figura 103 - Espectro de massa obtido para a solução de Q1 com a porfirina 4	206
Figura 104 - Espectros de massa dos oligonucleotídeos: A - TG ₄ T; B - T ₂ AG ₃ ; C - T ₂ G ₅ T.....	207
Figura 105 - Espectro de massa do oligonucleotídeo TG ₄ T	210
Figura 106 - Espectro obtido para o oligonucleotídeo Q1 e a porfirina 9.....	211
Figura 107 - Espectro de MS/MS do aducto $[qs+3NH_4^++9-10H^+]^{4-}$	212

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Abundâncias relativas dos iões M^+ e $[M+2H]^+$ (%CIT) obtidas para a porfirina 9	64
Tabela 2 - Espectros de iões produto de M^{3+} , M^{2+} e $[M+2H]^{2+}$	67
Tabela 3 - Principais iões-fragmento obtidos para os iões $[M+2H]^+$ e $[(M-2H+2D)+2D]^+$ para a porfirina 13	78
Tabela 4 - Principais iões observados nos espectros de massa das várias porfirinas.....	86
Tabela 5 - Resultados das determinações de massas exactas obtidos para os iões com m/z 875	114
Tabela 6 - Resultados das determinações de massas exactas obtidos para os iões com m/z 920	114
Tabela 7 - Resultados das determinações de massas exactas obtidos para os iões com m/z 893	114
Tabela 8 - Composições elementares, fórmulas propostas e razões massa/carga dos iões em discussão	115
Tabela 9 - Dados obtidos nos espectros de MS^3 ($920 \rightarrow 875 \rightarrow$ iões-produto) para os corróis 2 e 3 a 60% e 85% de energia de colisão normalizada	117
Tabela 10 - Entalpias de formação calculadas para os iões $[(M-py)-H]^+$, $[(M-py)+H-(CH_3)_2NH]^+$ e $[(M-py)+H-(CH_3)_2NH-HF]^+$	124
Tabela 11 - Entalpias de formação para os iões com m/z 893	125
Tabela 12 - Energias de ligação dos principais tipos de ligação química	166
Tabela 13 - Sequências de oligonucleotídeos utilizadas e respectivas massas monoisotópicas e fórmulas elementares	201
Tabela 14 - Condições experimentais testadas para formação de Q1.....	202
Tabela 15 - Condições instrumentais testadas	209

PREFÁCIO

Pretendeu-se com o presente trabalho explorar as potencialidades da espectrometria de massa com ionização por Electrospray (ESI-MS) no estudo de interações não-covalentes entre estruturas de ordem superior do ADN, os G-quadruplexes, e potenciais fármacos, porfirinas catiónicas e neutras.

As porfirinas usadas no estudo anterior, bem como outros macrociclos tetrapirrólicos, os corróis, foram também objecto de investigação, uma vez que a sua caracterização por ESI-MS revelou a ocorrência de processos inesperados e pouco comuns.

A presente dissertação é composta por cinco capítulos sendo descritos, nos capítulos 2, 3 e 5, os estudos referidos anteriormente.

No primeiro capítulo é feita uma breve introdução à espectrometria de massa e é descrita a instrumentação usada nestes estudos.

No segundo capítulo é descrita a caracterização de dois grupos distintos de porfirinas, um constituído por *meso*-tris(*N*-metilpiridil)porfirinas e o outro por *meso*-tetraquis(*N*-alquilpiridil)porfirinas, por ESI-MS no modo de iões positivos. Para ambos os grupos de porfirinas foi observada a ocorrência de reduções durante o processo global de nebulização e formação de iões.

No terceiro capítulo são descritos os resultados obtidos durante a caracterização por ESI-MS nos modos de iões positivos e negativos, de dois isómeros de aminocorróis, nomeadamente a formação de aductos de corróis com moléculas de água na câmara de colisões.

No quarto capítulo é feita uma descrição dos componentes e estruturas do ADN, com incidência nos G-quadruplexes, que são estruturas de ordem superior formadas em zonas do ADN ricas em guaninas e que estão presentes nos telómeros humanos.

No último capítulo é descrito o estudo de aductos quadruplex-porfirina usando a espectrometria de massa com ionização por Electrospray no modo de iões negativos. Usaram-se porfirinas com diferente número de cargas positivas, e

de substituintes, para investigar a influência destes factores na formação e estabilidade dos aductos.

O trabalho de investigação apresentado nesta tese deu origem à publicação (primeira autora) de 4 artigos científicos, 3 publicados e 1 em fase de impressão, respectivamente:

C. I. V. Ramos, C. M. Barros, M. G. Santana-Marques, A. J. Ferrer Correia, J. P. C. Tomé, A. C. Tomé, M. G. P. M. S. Neves, J. A. S. Cavaleiro

Reduction of Cationic Free Base meso-tris-N-methylpyridinium-4-yl Porphyrins in Positive Mode Electrospray Ionization Mass Spectrometry

Journal of the American Society for Mass Spectrometry, **2007**, 18, 762

C. I. V. Ramos, M. G. Santana-Marques, A. J. Ferrer Correia, J. P. C. Tomé, C. M. Alonso, A. C. Tomé, M. G. P. M. S. Neves, J. A. S. Cavaleiro.

Reduction and adduct formation from electrosprayed solutions of porphyrin salts

Journal of Mass Spectrometry, **2008**, 43, 806

C. I. V. Ramos, M.G. Santana-Marques, J. P. C. Tomé

Effects of charge and substituent in the stability of porphyrin adducts with G-quadruplexes

Journal of Mass Spectrometry, **2012**, 47(2), 173

C. I. V. Ramos, M. G. Santana-Marques, A. J. Ferrer-Correia, J. F. B. Barata, A. C. Tomé, M. G. P. M. S. Neves, J. A. S. Cavaleiro, P. E. Abreu, M. M. Pereira, A. A. C. C. Pais

Differentiation of Aminomethyl Corrole Isomers by Mass Spectrometry

Journal of Mass Spectrometry, 2012 *in press*

CAPÍTULO 1.

INTRODUÇÃO À ESPECTROMETRIA DE MASSA

1.1 - Considerações gerais

A grande popularidade da espectrometria de massa resulta das suas características únicas, tais como a sua capacidade de fornecer a massa molecular dos componentes da amostra a analisar e a sua elevada sensibilidade de detecção. Para além disso, apresenta também grande versatilidade na determinação de estruturas para um grande número de compostos e é aplicável a vários tipos de amostras, sólidas ou líquidas, contendo iões voláteis e não voláteis.

Até aos anos 50 do século passado, as principais aplicações da espectrometria de massa eram apenas a identificação de isótopos, a determinação de abundâncias relativas e a medição de massas exactas, no caso de gases, amostras voláteis ou amostras que não sofressem alterações estruturais significativas, quando convertidas em derivados voláteis. Os estudos por espectrometria de massa eram realizados recorrendo principalmente a instrumentos de sector e a métodos de ionização como a ionização electrónica (EI) e a ionização química (CI).

A necessidade de analisar amostras biológicas, polares e não-voláteis, levou ao desenvolvimento de outros métodos de ionização, nomeadamente técnicas envolvendo o bombardeamento por partículas (átomos ou iões) com recurso a matrizes líquidas pouco voláteis, como a espectrometria de massa de iões secundários LSIMS (Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry) e o bombardeamento por átomos rápidos, FAB (Fast Atom Bombardment).

Mais tarde, desenvolveram-se técnicas de ionização mais “suaves”, Electrospray (ESI) e MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization). A técnica de Electrospray tornou possível a análise, com elevada eficiência, de espécies iónicas a partir de soluções. O facto de esta técnica gerar iões multicarregados tornou ainda possível a análise de moléculas de elevada massa molecular, como por exemplo fracções de ADN.

A introdução destas novas técnicas de ionização, que vieram permitir a determinação da massa de compostos de elevada massa molecular, com uma

precisão sem precedentes e utilizando uma quantidade de amostra reduzida, tornou possível a utilização da espectrometria de massa em áreas como a biologia, a bioquímica e a medicina, sendo hoje uma das técnicas mais usadas na caracterização estrutural de biomoléculas.

A espectrometria de massa é hoje uma técnica instrumental muito potente, versátil e completa, uma vez que, é rápida (permite obter espectros em décimas de segundo) e sensível (pode detectar pequenas quantidades de substância, da ordem de 10^{-15} mol dm⁻³), fornece informação sobre a estrutura das moléculas e a sua composição isotópica e permite analisar quantitativamente misturas complexas (quando associada a técnicas de separação cromatográfica).

1.2 - Breve perspectiva histórica

A origem da espectrometria de massa está associada às importantes transformações que ocorreram nas áreas da Física e Química durante os finais do século XIX e o início do século XX. Descobertas, tais como a radioactividade, os raios-X, o electrão e o núcleo atómico despoletaram o desenvolvimento de novos métodos experimentais.

Com base em trabalhos de W. Wien e E. Goldstein, J. J. Thomson desenvolveu um sistema envolvendo uma placa fotográfica, no qual obteve, através da ionização do néon, um registo onde foram identificadas duas marcas distintas, inicialmente interpretadas como se este gás fosse uma mistura de dois componentes. Mais tarde¹, a presença de massas diferentes neste gás foi atribuída aos seus isótopos estáveis (^{20}Ne , ^{21}Ne e ^{22}Ne).

No sistema desenvolvido por J. J. Thomson, um feixe de partículas positivas era desviado por um campo eletromagnético, formando curvas visíveis (parábolas), cada uma delas associada a um valor de razão massa/carga da partícula (figura 1).

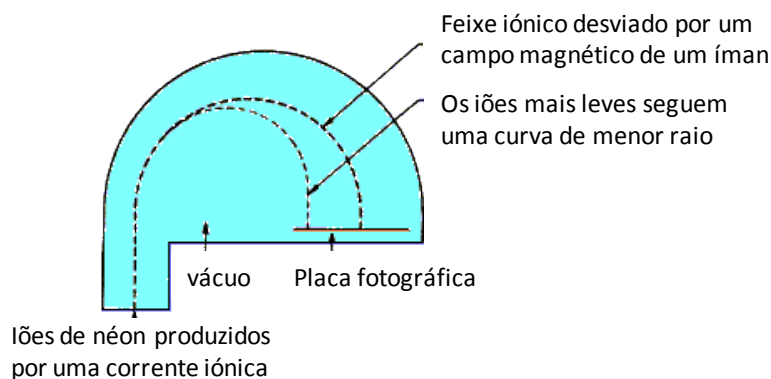


Figura 1 - Diagrama do sistema desenvolvido por Thomson²

F.W. Aston, um aluno assistente de J.J. Thompson, aperfeiçoou o sistema desenvolvido por Thomson e introduziu um novo alinhamento dos campos eletromagnéticos que permitiu uma melhor focagem dos iões desviados sobre a placa fotográfica. Estas modificações culminaram no desenvolvimento do primeiro espectrógrafo de massa (figura 2). A principal diferença entre o sistema de J. J.

Thomson e o espectrógrafo de Aston residia na posição dos campos elétrico e magnético: no sistema inicial, estes eram aplicados de maneira perpendicular e simultânea e no espectrógrafo a sua aplicação era consecutiva e num mesmo plano.



Figura 2 - Espectrógrafo desenvolvido por Aston³

Mais tarde, em 1918, A. J. Dempster desenvolveu o primeiro espectrómetro de massa que usava fontes de ionização térmica e ionização electrónica.

De 1918 até ao presente, a evolução da espectrometria de massa tem sido constante e as suas aplicações cada vez mais numerosas, pelo que serão apenas mencionados as principais descobertas e os avanços que contribuíram para a aplicação desta técnica ao estudo de macromoléculas e aductos não-covalentes, como os do presente trabalho.

1922 - F. Aston recebe o prémio Nobel da Química pela descoberta dos isótopos, usando o espectrógrafo de massa

1933 - N. Barber publica a teoria da focagem angular em sectores magnéticos

1934 - R. Herzog e Z. Matlack apresentam o primeiro espectrógrafo de dupla focagem

1936 - A espectrometria de massa de iões secundários é utilizada pela primeira vez

- 1940** - O primeiro espectrómetro de massa portátil para fins comerciais é desenvolvido
- 1946** - A primeira descrição de um analisador de tempo de voo é feita
- 1952** - A. Nier e E. Jonhson apresentam um espectrómetro de massa de focagem dupla (focagem dos iões num único ponto)
- 1953** - W. Paul publica os primeiros artigos sobre o quadropólo e a trapa de iões
- 1954** - A espectrometria de massa de alta resolução (compostos orgânicos) é desenvolvida
- 1959** - A espectrometria de massa é usada pela primeira vez na sequenciação de peptídeos e oligonucleotídeos; a cromatografia gasosa e a espectrometria de massa são acopladas pela primeira vez
- 1962** - A espectrometria de massa é usada pela primeira vez no estudo da estrutura de nucleosídeos
- 1966** - A espectrometria de massa tandem é desenvolvida
- 1968** - A técnica de Electrospray é aplicada ao estudo de macromoléculas
- 1971** - Um analisador de tempo de voo (ToF) equipado com reflectão é desenvolvido
- 1976** - A espectrometria de massa tandem é aplicada, pela primeira vez, para análise de misturas
- 1980** - O primeiro triplo quadropolo comercial é produzido
- 1981** - N. Barber e colaboradores apresentam a ionização por bombardeamento por átomos rápidos (FAB - fast atom bombardment).
- 1982** - O primeiro espectro de massa da insulina é obtido (FAB e outros métodos de desadsorção)
- 1984** - A primeira trapa de iões é comercializada; a ionização por Electrospray é aplicada a biomoléculas pequenas
- 1987** - M. Karas e F. Hillenkamp apresentam a técnica de MALDI

- 1988** - A espectrometria de massa com ionização por Electrospray (ESI-MS) é aplicada, pela primeira vez, para analisar proteínas com massas moleculares compreendidas entre 5 e 40 kDa.
- 1989** - W. Paul recebe o prémio Nobel da Física pelo desenvolvimento da trapa de iões; o primeiro espectrómetro de massa com ionização por Electrospray é comercializado
- 1991** - A ESI-MS é usada pela primeira vez na sequenciação de oligonucleotídeos
- 1992** - Um equipamento ToF com reflectão é utilizado para obter informação estrutural de compostos
- 1994** - O micro e o nanoelectrospray são introduzidos
- 2002** - J. Fenn e K. Tanaka recebem o prémio Nobel da Química pelo desenvolvimento das técnicas de Electrospray e MALDI.

Os progressos e as inovações constantes, não apenas ao nível da sensibilidade, da gama de massas analisada e da velocidade de análise, mas também ao nível do “design” e da evolução das bases de dados, tornam os espectrómetros de massa cada vez mais rápidos e mais fáceis de operar e permitem a sua aplicação numa vasta gama de áreas científicas.

1.3 - Espectrómetros de massa: estrutura básica e componentes

Qualquer espectrómetro de massa é constituído pelos seguintes componentes fundamentais:

- um sistema de introdução da amostra;
- uma fonte de iões;
- um analisador para separar os iões de acordo com a sua razão massa/carga;
- um detector/amplificador que regista o sinais dos iões formados;
- um sistema informático de aquisição e tratamento de dados;

Todos ou parte dos componentes, dependendo do tipo de aparelho, são mantidos em alto vácuo, pelo que todos os espectrómetros possuem um sistema de vácuo.

A primeira etapa em qualquer análise por espectrometria de massa é a ionização da amostra que ocorre na fonte de ionização. Os iões formados, positivos ou negativos, são imediatamente acelerados em direcção ao analisador.

O analisador de massa separa esses iões e os seus fragmentos carregados, (iões formados devido a excesso de energia interna transferida para a molécula durante o processo ionização) de acordo com sua razão massa / carga (m/z).

O detector recebe os iões que foram separados pelo analisador e transforma a sua corrente iónica em corrente eléctrica (electrões) amplificando esta última. A intensidade da corrente iónica é directamente proporcional à abundância dos iões formados.

Os sinais eléctricos amplificados são processados e armazenados por computadores acoplados.

Um espectro de massa é a representação gráfica da abundância relativa dos iões em função da sua razão massa/carga.

De forma a tornar possível a livre circulação dos iões no seu percurso, até atingirem o detector, sem colidirem/interagirem entre si ou com outras espécies, o espectrómetro de massa é mantido em alto vácuo (10^{-4} a 10^{-8} Torr).

A figura 3 mostra o esquema da estrutura básica de um espectrómetro de massa.

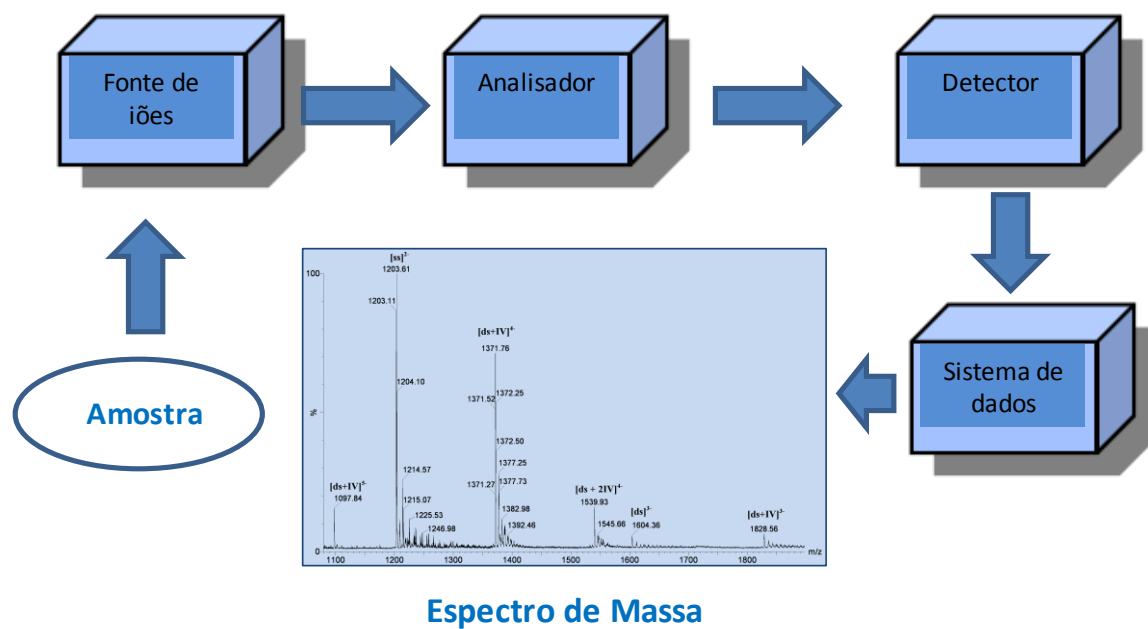


Figura 3 - Estrutura básica de um espectrómetro de massa

1.4 - Métodos de ionização

A ionização é o processo que envolve a conversão de átomos ou moléculas em iões (por adição ou remoção de partículas carregadas sejam elas electrões ou outros iões) ou a transferência de iões já existentes em fase líquida para a fase gasosa.

A formação de iões constitui o primeiro passo da análise de moléculas utilizando um espectrómetro de massa. O primeiro método a ser utilizado na ionização de moléculas orgânicas foi o bombardeamento por um feixe de electrões. As moléculas bombardeadas perdiam um electrão dando origem a iões radicais positivos $M^{+\bullet}$, possuindo a mesma massa da molécula e designados por iões moleculares. Alguns dos iões moleculares eram formados com excesso de energia interna fragmentando-se em espécies neutras e iões de massa inferior.

Existem hoje diversos métodos de ionização, que têm diferentes aplicações consoante as substâncias em análise. Além dos iões moleculares $M^{+\bullet}$, outras espécies, monocarregadas como os iões $[M+H]^+$ e $[M + Cat]^+$ (Cat = Na, K, etc.) ou multicarregadas como os iões M^{n+} e $[M+nH]^{n+}$ ($n>1$) podem ser observadas, incluindo estruturas iónicas complexas, como algumas biomoléculas e aductos formados por ligações não-covalentes.

No presente trabalho serão apenas referidos os métodos de ionização utilizados para a análise de interacções não-covalentes, nomeadamente Electrospray e MALD.

1.4.1 - Ionização por Electrospray

J. Zeleny, em 1917, foi o primeiro cientista a descrever a nebulização por Electrospray⁴, mas somente a partir de 1968, o grupo liderado por M. Dole desenvolveu esta técnica para transferir iões, da fase líquida para fase gasosa.^{5,6,7} Contudo, os grandes avanços desta técnica ocorreram a partir de 1983, quando J. Fenn a usou para análise de macromoléculas.⁸

Desde que surgiu, o Electrospray tornou-se numa das técnicas analíticas mais poderosas e amplamente utilizadas. As principais vantagens do Electrospray são a sua elevada sensibilidade e selectividade, o consumo reduzido de amostra e o facto de ser compatível com diferentes fluxos de introdução de amostra e solventes.

Entre as características que fazem do Electrospray um método distinto dos outros métodos de ionização podemos referir a sua capacidade de produzir iões multicarregados, reduzindo assim a razão massa/carga do ião e tornando possível a análise de compostos de elevada massa molecular.

As amostras são introduzidas no espectrómetro em solução permitindo assim o acoplamento com técnicas de separação, como a cromatografia líquida, o que se revelou fundamental na análise de amostras biológicas, geralmente em solução. Por se tratar de uma técnica de ionização “suave”, a fragmentação da amostra a analisar é nula ou reduzida durante o processo de ionização. Além disso o Electrospray é uma técnica que pode operar à pressão atmosférica. O aparecimento das técnicas a pressão atmosférica provocou um grande avanço na análise de amostras pouco voláteis e termolábeis, conduzindo a um aumento do limite prático de ionização para valores de massa na ordem dos 150 a 200 kDa e a uma elevada eficiência de ionização.

O processo de ionização por Electrospray (figura 4) ocorre nas seguintes etapas:

- formação de gotas electricamente carregadas a partir de uma solução;
- diminuição do volume da gota por evaporação do solvente e/ou por desintegração repetida;

A formação de gotas resulta da aplicação de um campo eléctrico forte a uma solução contendo a amostra, que passa no interior de um tubo capilar com um fluxo baixo ($1-10 \mu\text{l}.\text{min}^{-1}$), onde é nebulizada (formação de um spray de gotículas finas).

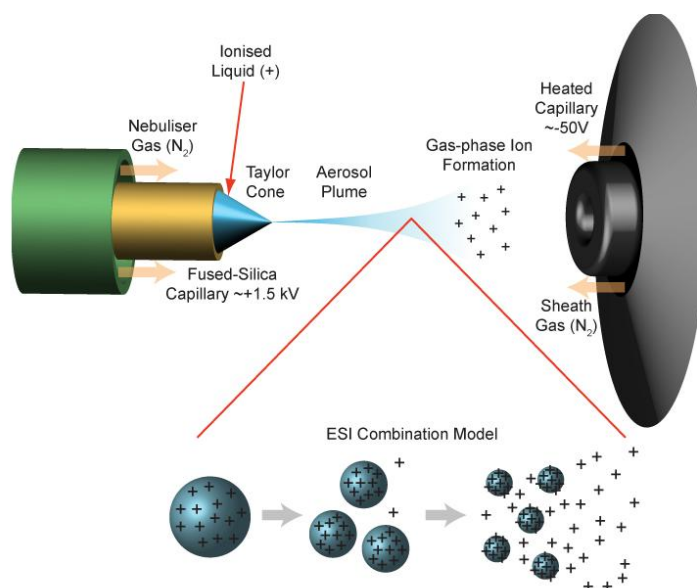


Figura 4 - O processo de ionização por Electrospray⁹

O campo eléctrico é obtido por aplicação de uma diferença de potencial (3 - 6 kV) entre o capilar e um contra-eléctrodo, separados por uma distância de 0.3 a 2 cm. Este campo induz uma acumulação de carga na superfície do líquido na extremidade do capilar (formação do cone de Taylor), ocorrendo posteriormente uma quebra de fluxo com formação de gotículas altamente carregadas.

Este processo é auxiliado por um gás inerte, geralmente o azoto, designado por gás de nebulização, introduzido na fonte, externamente ao capilar. Este gás está a elevadas temperaturas (150-200 °C) e auxilia a evaporação do excesso de solvente e a formação das gotículas.

O solvente contido nestas gotículas evapora-se, o que vai provocar contracção daquelas até a um ponto de instabilidade (limite de Rayleigh) em que as forças coulombianas de repulsão se aproximam das forças de coesão (tensão superficial), provocando então a “explosão” dessas partículas/gotículas.

Embora os mecanismos envolvidos no processo de Electrospray não tenham sido ainda completamente elucidados, foram propostos dois modelos distintos (figura 5) para a sua interpretação: o modelo do resíduo carregado¹⁰ (CRM - *charged residue model*) proposto por Dole *et al.* e o modelo da evaporação de iões^{11,12} (IEM - *ion evaporation model*) proposto por Thomson e

Iribarne. Qualquer destes mecanismos tem início com a formação de um spray de gotículas.

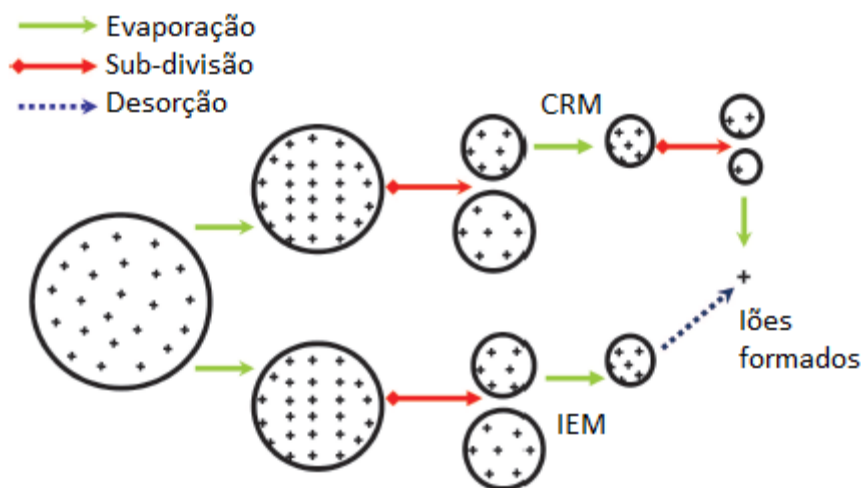


Figura 5 - Modelos propostos para formação de íões em Electrospray¹³

No seu modelo, Dole *et al.* propuseram que as gotículas geradas pelo Electrospray passavam por ciclos de evaporação e cisão que levavam à formação de gotículas tão pequenas que cada uma delas conteria apenas uma molécula de soluto. Os íões seriam formados em fase gasosa à medida que as últimas moléculas de solvente se evaporavam e iriam reter toda ou parte da carga da gotícula inicial.

Segundo Iribarne e Thomson, antes de uma gota se tornar suficientemente pequena para conter apenas uma molécula de soluto, a densidade de carga na sua superfície tornar-se-ia tão elevada que o campo eléctrico superficial resultante seria suficientemente intenso para provocar a passagem de um ou mais desses íões superficiais para a fase gasosa. Dessa forma, seriam formados íões em fase gasosa de, pelo menos, algumas dessas moléculas de soluto. A contínua evaporação do solvente a partir de gerações sucessivas dessas gotas carregadas iria resultar na passagem de uma parte ou de todos esses catiões ou aniões da superfície dessas gotas originais para a fase gasosa.

1.4.2 - Ionização por MALD

O método de ionização conhecido como MALD foi introduzido nos finais dos anos 80 do século passado por dois grupos independentes, o grupo de M. Karas e F. Hillenkamp¹⁴ e o grupo de K. Tanaka.^{15,16}

A principal diferença entre os métodos de ionização propostos pelos dois grupos centrava-se no método de preparação da amostra. O método de preparação de Karas e Hillenkamp envolvia a utilização, como matriz, de ácido nicotínico (sólido), enquanto o método de Tanaka consistia na dissolução da amostra numa mistura de glicerol e partículas de cobalto. O método de Karas e Hillenkamp foi o que teve maior aceitação porque apresentava uma sensibilidade muito superior, quando comparada à obtida usando método proposto por Tanaka.

O método de ionização por MALD, de acordo com Karas e Hillenkamp, consiste na irradiação por laser do analito disperso numa matriz sólida, que tem a capacidade de absorver a radiação no comprimento de onda do laser usado. A matriz minimiza os danos causados na amostra durante a incidência do laser e permite a ejeção das moléculas de analito (assim como as de matriz) para a fase gasosa.

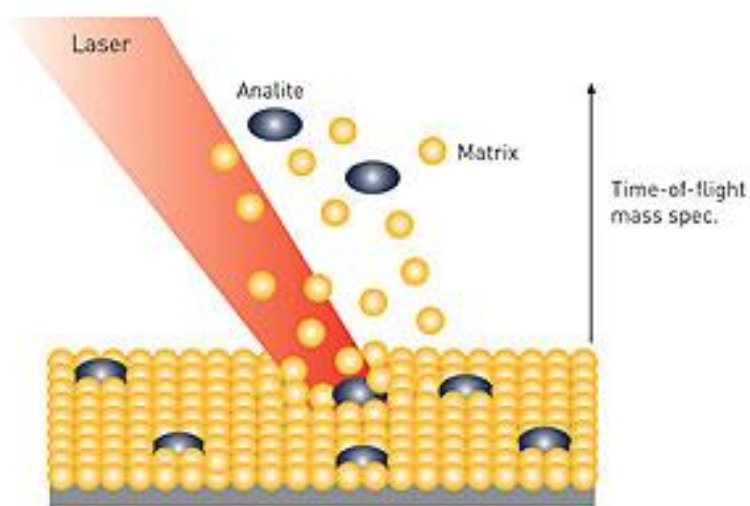


Figura 6 - O processo de ionização por MALD¹⁷

A dispersão do analito na matriz envolve a mistura da solução do analito com uma solução saturada de matriz, que, após aplicação na placa de amostragem, conduz à formação de uma superfície sólida.

A matriz tem um máximo de absorção na zona do comprimento do laser usado e, por seu lado, a amostra não tem um máximo de absorção nessa zona (figura 7). A matriz absorve então a radiação e parte da energia absorvida é transmitida à amostra. Após a desadsorção, os iões são acelerados para o interior do analisador.

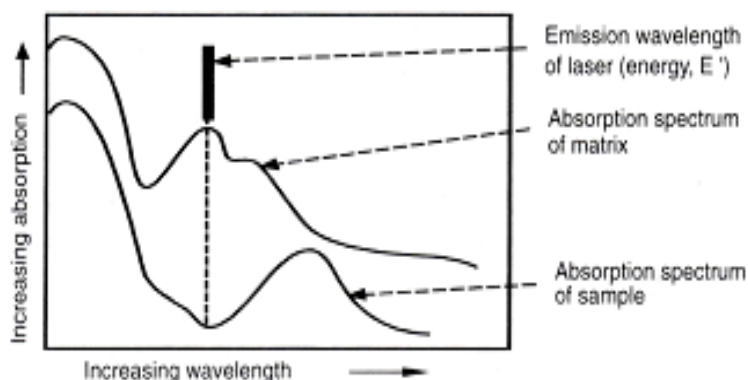


Figura 7¹ - Espectro de absorção da matriz e do analito em função do comprimento de onda do laser¹⁸

A escolha da matriz assume grande importância em qualquer análise por MALDI, uma vez que:

- é usada como meio de transferência de energia para a amostra, absorvendo a energia emitida pelo laser;
- serve como factor de diluição da amostra impedindo a associação das moléculas de analito;
- proporciona um meio de transferência de carga para a amostra.

A escolha da matriz a utilizar depende do tipo de amostra a analisar, sendo as matrizes mais utilizadas em MALDI de compostos orgânicos, como por exemplo o ácido 3-hidroxipicolínico usada na análise de oligonucleotídeos e o

¹ Anteriormente a 2003 esta figura estava disponível na internet donde foi retirada

ácido 2-(4-hidroxi-fenilazo)-benzóico (HABA) usado na análise de proteínas e oligossacarídeos.

A deposição de uma gota da mistura matriz-analito e a cristalização dessa gota à temperatura ambiente denomina-se método da gota-seca (*dry-drop*) e é um dos métodos de preparação da mistura matriz-analito mais usado devido à sua facilidade e simplicidade de preparação.

A irradiação ocorre em curtos períodos de tempo de forma pulsada, para evitar decomposição térmica da amostra, sendo um dos lasers mais usados o laser de N₂, pulsado a 337 nm.

Os iões formados são, de uma forma geral, monocarregados, protonados se analisados no modo de iões positivos, ou desprotonados se analisados no modo de iões negativos. Contudo, também se podem formar iões com duas ou mais cargas resultantes da formação de aductos³² com outros iões, como o Ca²⁺.

1.4.3 - Electrospray e MALDI na análise de aductos não-covalentes

A técnica de Electrospray é mais usada do que a de MALDI, para análise de macromoléculas¹⁹ e aductos do tipo dos estudados neste trabalho, uma vez que, como foi anteriormente referido, durante o processo de Electrospray há formação de iões multicarregados, o que permite a análise de compostos com massas moleculares elevadas. Além disso, a energia interna dos iões formados por Electrospray é geralmente inferior à dos iões formados por MALDI, o que é especialmente importante no caso de aductos não-covalentes com ligações mais fracas.

No processo de MALDI cargas superiores a 1 são muito pouco comuns. Por isso esta técnica apresenta uma resolução menos boa, principalmente quando são analisados compostos com massa molecular elevada.²⁰

A análise por MALDI de compostos de baixa massa molecular pode também apresentar problemas devido à presença dos sinais correspondentes à matriz²¹, que podem ser relativamente intensos e interferir com os sinais do analito. Em Electrospray este problema não acontece, sendo esta uma boa

técnica para análise de amostras, quer de baixa quer com elevada massa molecular.

No caso de aductos não-covalentes a técnica de Electrospray permite a análise directa a partir de soluções em condições fisiológicas ($\text{pH}=7$) e como o processo de ionização é menos energético, permite a passagem à fase gasosa de espécies ligadas não-covalentemente, com energias de ligação bastante baixas.

A técnica de MALDI é limitada a espécies cuja energia de ligação é mais elevada e a preparação da amostra (co-dissolução com a matriz) é feita a um pH não fisiológico (geralmente $\text{pH}<5$), embora a utilização de matrizes mais básicas ($5 < \text{pH} < 8$) tenha vindo a ser implementada.²² Em contra-partida, a técnica de MALDI é mais “tolerante”, do que a técnica de Electrospray, no que diz respeito à presença de sais e tampões, que são muitas vezes necessários para estabilizar os complexos não-covalentes.

1.5 - Analisadores

As três principais características de um analisador são o limite de massa, a transmissão e a resolução. O limite de massa é determinado pelo valor máximo de razão massa/carga que pode ser medido; a transmissão é a razão entre o número de iões que atingem o detector e aqueles que são produzidos na fonte, e a resolução é a capacidade de distinguir sinais de dois iões cujas razões massa/carga sejam muito próximas.

Há vários tipos de analisadores: analisadores de sector, quadrupolos, analisadores de tempo de voo e trapa de iões (*Ion Trap*) e híbridos.¹⁸

O analisador que foi mais utilizado neste trabalho foi um híbrido designado por Q-ToF (figura 8) que resulta da conjugação de dois analisadores: um quadrupolo (Q) e um analisador de tempo de voo (ToF). O quadrupolo é usado para seleccionar iões que vão depois ser analisados pelo analisador de tempo de voo. Uma parte do trabalho envolveu a utilização de um espectrómetro de massa do tipo “*Ion Trap*”.

Seguidamente ir-se-á apresentar uma breve descrição dos três analisadores utilizados.

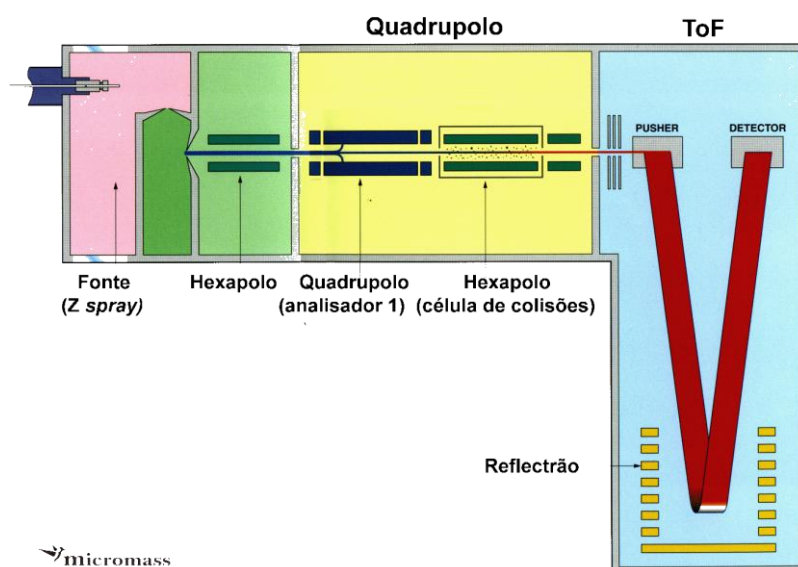


Figura 8 - Constituintes de um analisador Q-ToF equipado com reflectrão²³

1.5.1 - Quadrupolo - Q

Os quadrupolos (figura 9) utilizam campos eléctricos oscilantes, gerados por quatro barras metálicas (quatro pólos, dois negativos e dois positivos, dispostos alternadamente), para estabilizar ou desestabilizar selectivamente os iões, de acordo com a sua razão massa/carga, durante a passagem pelo centro do quadrupolo.

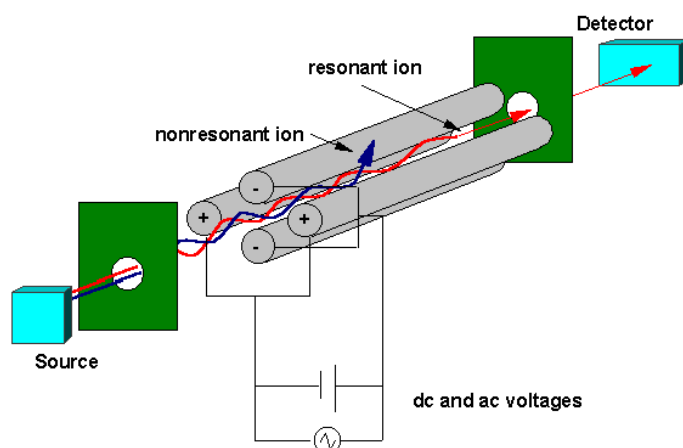


Figura 9 - Constituintes de um analisador do tipo quadrupolo²⁴

A secção dos quatro pólos é circular (idealmente hiperbólica). É aplicada uma diferença de potencial a cada par cruzado, positivo ou negativo, que provoca uma vibração (estável ou instável) dos iões. Apenas os iões com determinada razão massa/carga vibram de forma estável no decurso da sua trajectória e apenas estes vão atingir o segundo analisador (ToF).

1.5.2 - Tempo de voo - ToF

Quando um conjunto de iões é acelerado a partir de um mesmo ponto e ao mesmo tempo, numa região livre de campos eléctricos ou magnéticos, estes adquirem a mesma energia cinética. Assim, consoante a sua massa, os iões vão ter diferentes velocidades e vão chegar ao detector em tempos diferentes.

No entanto, se um ião se fragmentar durante o “voo” (com ou sem alteração da sua carga) os fragmentos vão ser detectados ao mesmo “tempo de voo” da espécie inicial, o que se reflecte num baixo poder de resolução. Este problema pode ser ultrapassado com a introdução de um “reflectrão” também designado por espelho electrónico (figura 10).

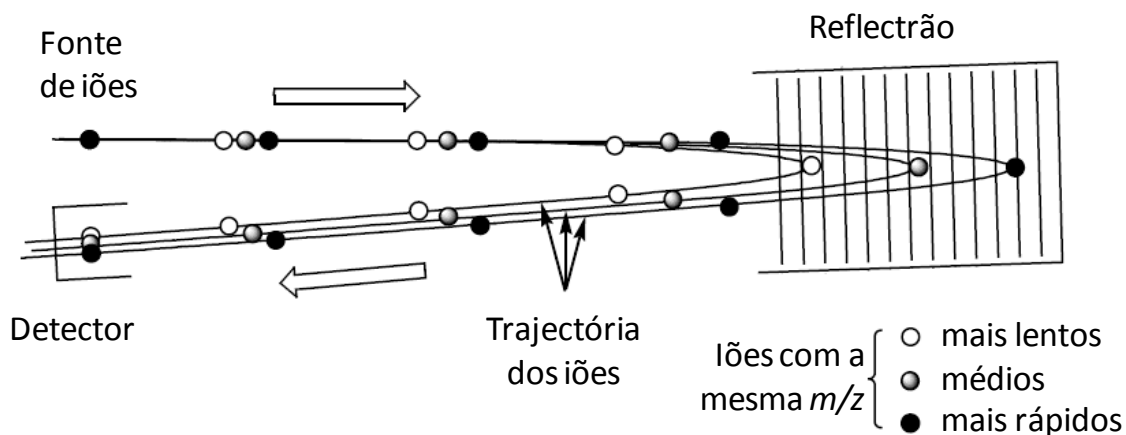


Figura 10 - Representação do modo de funcionamento de um reflectrão

O uso do reflectrão vai produzir melhorias consideráveis em termos de resolução. Os iões, no fim do seu percurso inicial, penetram num sistema de lentes electrostáticas com voltagens crescentes (até um valor ligeiramente superior ao da voltagem da fonte), sendo desacelerados até possuírem uma energia nula e depois acelerados com energias idênticas, mas de sentido inverso, demorando mais ou menos tempo a serem reflectidos, consoante a energia inicial. Este sistema filtra as moléculas neutras e corrige o tempo de dispersão, o que se vai reflectir num aumento de resolução e numa maior exactidão na determinação de massas moleculares.

Na figura 11 está representada a diferença de resolução obtida num analisador de tempo de voo linear e num analisador de tempo de voo equipado com “reflectrão”.

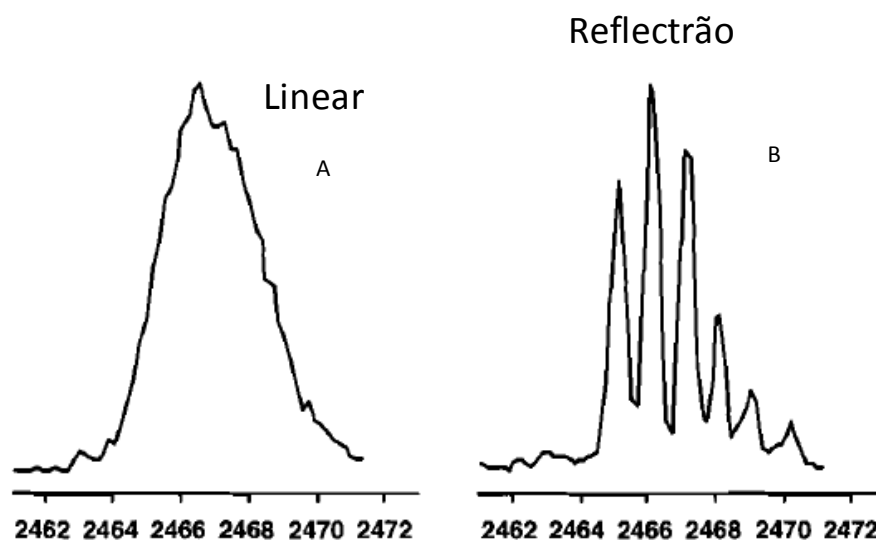


Figura 11 - Diferença de resolução dos espectros obtidos com A - ToF linear e B - ToF equipado com reflectrão

1.5.3 - Trapa de iões - Ion Trap

As trapas de iões (*ion trap*) foram desenvolvidas por W. Paul em 1960, que foi galardoado com o Prémio Nobel de Física, em 1989, por esta descoberta.^{25,26}

Os analisadores deste tipo baseiam-se em princípios físicos semelhantes aos do quadrupolo. Estes analisadores são de facto um quadrupolo tridimensional²⁷. A base do seu funcionamento consiste na captura dos iões numa “caixa”, por aplicação de um campo eléctrico e na sua ejeção selectiva, de acordo com a sua razão massa/carga.¹⁸

Este analisador (figura 12) é constituído por três eléctrodos: um central, eléctrodo de anel, que tem um formato circular, e dois outros situados nas extremidades, eléctrodos de “tampa”, com geometria hiperbólica.²⁸

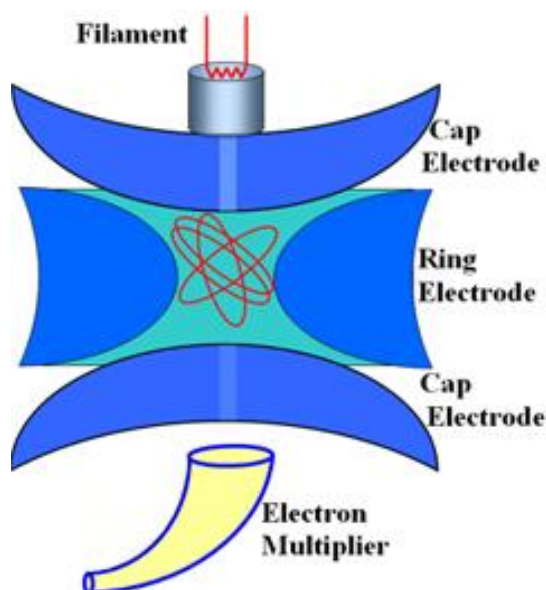


Figura 12 - Constituintes de um analisador trapa de iões²⁹

Aos eléctrodos das extremidades é aplicada uma voltagem de corrente contínua, U , e ao eléctrodo de anel é aplicada uma voltagem de rádio frequência, RF. Em contraste com o que acontece no quadrupolo, os iões, após serem introduzidos na “caixa”, são sujeitos a um campo eléctrico oscilatório mantendo-se em órbitas estáveis. A ejeção sucessiva dos iões de acordo com a sua razão massa/carga faz-se através da aplicação de uma “rampa” crescente de voltagens de alta frequência²⁶ permitindo a obtenção de espectros de massa.²⁷

Este analisador é um equipamento compacto e com uma mecânica simples. Tem também elevada sensibilidade, apresenta elevada resolução e permite fazer análises de sequenciação. No entanto, a sua principal vantagem é a possibilidade de efectuar análises por espectrometria de massa de multiestágios (MS^n , onde n corresponde ao número de fragmentações consecutivas envolvidas subtraído de uma unidade), uma vez que como os iões são “aprisionados” no interior do analisador, é possível realizar diversas etapas de fragmentação consecutivas.

1.6 - Detectores

Existem vários tipos de detectores e o funcionamento da maior parte deles baseia-se na formação de um sinal eléctrico aquando da chegada de um ião. Como exemplo podemos mencionar o multiplicador de electrões, o detector de “Taça de Faraday” e o multiplicador fotónico, também designado por cintilador.

O detector usado no presente trabalho foi um multiplicador de electrões extremamente eficiente e de grande sensibilidade, o multiplicador de microcanais ou MCP (Microchannel Plate), pelo que se fará apenas uma breve descrição deste.

1.6.1 - Multiplicador de microcanais - MCP

Este detector é constituído por placas de vidro microperfuradas e cobertas por um revestimento metálico, às quais se pode aplicar uma diferença de potencial, V , da ordem dos 1500 V. Um detector MCP típico tem aproximadamente dez milhões de microcanais cujo diâmetro é aproximadamente 10 microns. Cada microcanal actua de forma independente como um fotomultiplicador contínuo (figura 13).

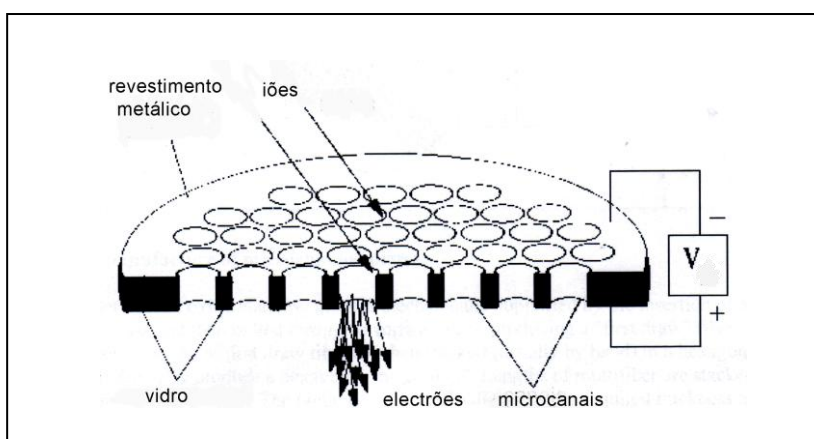


Figura 13 - Exemplo de uma placa constituinte do detector MCP³⁰

O funcionamento de um detector MCP (figura 14) pode descrever-se do seguinte modo: um ião incidente ao entrar num microcanal provoca a libertação de um electrão da parede deste; devido à diferença de potencial aplicada entre a entrada e saída do microcanal, o electrão libertado é acelerado e vai incidir na parede adjacente libertando vários electrões secundários; estes electrões são igualmente acelerados ao longo do microcanal e, por sua vez, vão incidir na superfície do microcanal libertando mais electrões. A repetição deste processo vai originar, à saída do microcanal, uma “nuvem” de vários milhares de electrões, o que se traduz num aumento do sinal da ordem dos 10^3 .

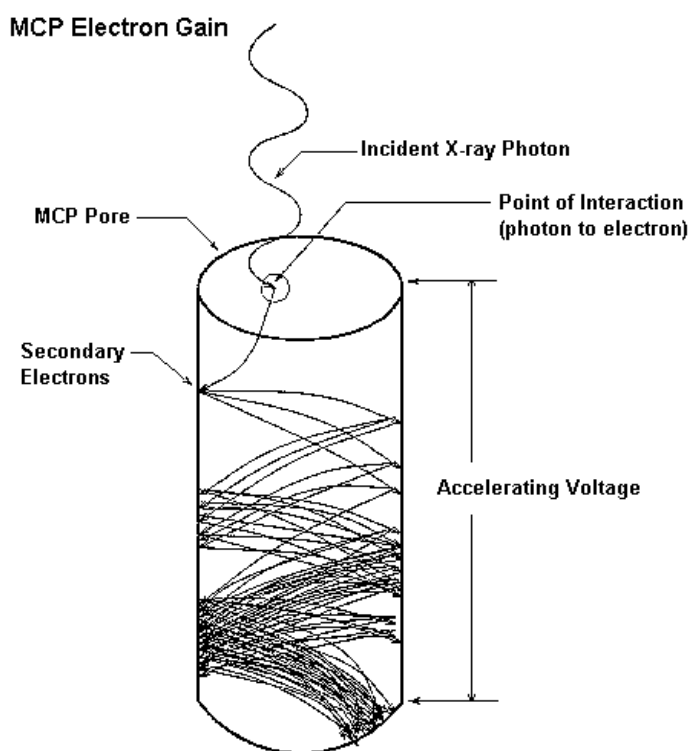


Figura 14 - Amplificação de sinal num microcanal³⁰

1.7 - Espectrometria de massa de multi-estágios (MS^n)

A espectrometria de massa de multiestágios, também designada por MS^n (n corresponde ao número de fragmentações consecutivas envolvidas subtraído de uma unidade) permite obter informações de natureza mais específica, tais como a elucidação estrutural de compostos desconhecidos, a identificação de compostos em misturas complexas, a elucidação de processos de fragmentação e também a quantificação de compostos em amostras reais.

Qualquer análise por espectrometria de massa de multiestágios envolve três etapas distintas: selecção, fragmentação e análise da massa dos fragmentos.

A primeira etapa envolve a selecção de um ião de massa específica de entre o conjunto de iões produzidos na fonte de ionização. Os iões seleccionados são designados iões precursores, e os iões que resultam da fragmentação são designados iões-produto. Os iões precursores são seleccionados por um primeiro analisador, passam para uma célula de colisões, onde sofrem fragmentação por colisão com um gás inerte (geralmente o árgon), os iões-fragmento formados entram depois num segundo analisador onde são analisados e separados de acordo com a sua razão massa/carga.³¹

Esta análise sequencial está geralmente associada à presença de dois ou mais analisadores de massa acoplados, embora possa ser efectuada em trapas de iões. Um dos acoplamentos mais comum é o que envolve um analisador quadrupolo e um analisador de tempo de voo (Q-ToF), sendo estes dois analisadores separados por uma célula de colisões (geralmente um hexapolo), onde ocorre a fragmentação dos iões precursores.^{32,33}

Devido à sua configuração, os espectrómetros com acoplamento do tipo Q-ToF permitem realizar apenas uma etapa de fragmentação ($n=2$), isto é, MS^2 . No entanto, a trapa de iões, permite várias etapas de fragmentação, possibilitando a realização de experiências MS^n ($n>2$).

Neste tipo de experiências, os iões-fragmento obtidos são seleccionados sendo os iões precursores da próxima etapa de fragmentação, MS^3 , e assim sucessivamente (MS^n). Esta característica é muito útil para a elucidação estrutural da(s) molécula(s) analisada(s).

Bibliografia

¹ Thomson JJ, Aston FW, Soddy F, Merton TR, Lindemann FA. *Proc. Roy. Soc.* **1921**; 99: 87

² http://www.feiradeciencias.com.br/sala23/23_MA04.asp (em 24-01-2012)

³ <http://www.ssplprints.com/image/94719/astons-first-mas-spectrograph-1919> (em 24-01-2012)

⁴ Zeleny J. *Phys. Rev.* **1917**; 10: 1

⁵ Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB. *J. Chem. Phys.* **1968**; 49: 2240

⁶ Clegg GA, Dole M. *Biopolymers* **1971**; 10: 821

⁷ Teer D, Dole M. *J. Polym. Sci.* **1975**; 13: 985

⁸ Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. *Science* **1989**; 246: 64

⁹ <http://www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/electrosprayionisation.php> (em 22-01-2012)

¹⁰ Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD. *Molecular. J. Chem. Phys.* **1968**; 49(5): 2240

¹¹ Iribarne JV, Thomson BA. *J. Chemi.Phys.* **1976**; 64(6): 2287

¹² Thomson BA, Iribarne JV. *J. of Chem. Phys.* **1979**; 71(11): 4451

¹³ Nguyen S, Fenn JB. *PNAS.* **2007**; 104 (4); 1111

- ¹⁴ Karas M, Hillenkamp F. *Anal. Chem.* **1988**; 60: 2299
- ¹⁵ Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**; 2: 151
- ¹⁶ Beavis RC. *Org. Mass Spectrom.* **1992**; 27: 653
- ¹⁷ <http://biopedia.org/index.php/MALDI-TOF-MS> (em 24-01-2012)
- ¹⁸ Herbert CG, Jonhstone RAW. *Mass Spectrometry Basics*. CRC Press, Florida. **2003**
- ¹⁹ Cech NB, Enke CG. *Mass Spectrom. Rev.* **2001**; 20: 362
- ²⁰ Elliot B. *Innovation & Precision in Nucleic Acid Synthesis*. Integrated DNA Technologies. **2005**
- ²¹ Sönksen C. *Biacore Journal* **2000**; 7: 18
- ²² Jerpersen S, Niessen WMA, Tjaden UR, Van der Greef J. *J. Mass Spectrom.* **1998**; 33: 1088
- ²³ http://thomson.iqm.unicamp.br/Q_TOF.htm (em 23-01-2012)
- ²⁴ <http://www.files.chem.vt.edu/chem-ed/ms/quadrupo.html> (em 24-01-2012)
- ²⁵ Todd JFJ. *Mass Spectrom. Rev.* **1991**; 10: 3
- ²⁶ March RE. *Ion traps*. In: *mass spectrometry Encyclopedia of Analytical Science*, Second Edition. Elsevier, Oxford **2005**; 5: 404

²⁷ Ardrey RE. *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: an Introduction..* John Wiley & Sons, Ltd, England. **2003**

²⁸ Fernández LE. *Carbohydr. Polym.* **2007**; 68: 797

²⁹ <http://departments.agri.huji.ac.il/zabam/Polaris-Q.html> (em 23-10-2011)

³⁰ <http://hea-www.harvard.edu/HRC/mcp/mcp.html> (em 23-10-2011)

³¹ Griffiths WJ, Jonsson AP, Rai DK, Wang Y. *Biochem. J.* **2001**; 355: 545

³² Hoffmann E, Stroobant V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications.* John Wiley & Sons, Chichester, UK. Third Edition. **2007**

³³ Dass C. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry.* John Wiley & Sons. New Jersey. **2007**

CAPÍTULO 2.

ASPECTOS SINGULARES DA QUÍMICA EM FASE GASOSA DE PORFIRINAS CATIÓNICAS

2.1 - Introdução

2.1.1 - Considerações gerais

Porphura, a origem da palavra porfirina, e de todas as suas variações relacionadas, vem do grego **πόρφυρος** (*porphuros*) que significa púrpura. O termo *Porphura* foi derivado do nome semítico para um precioso corante púrpura, extraído na antiguidade, em grande segredo, por fervura em água do muco da glândula hipobranquial de moluscos marinhos das famílias *purpura* e *murex*¹.

A primeira porfirina foi isolada, por tratamento da hemoglobina com ácido concentrado, por J. Thudichum² em 1867. Alguns anos mais tarde, por um processo semelhante, F. Hoppe-Seyler³ obteve uma substância roxa que designou por hematoporfirina (figura 15).

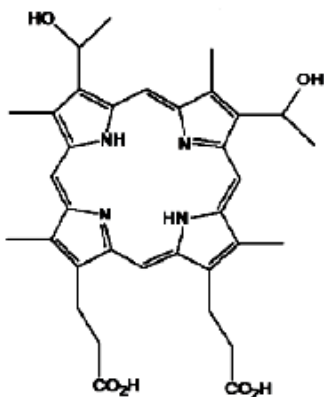


Figura 15 - Estrutura da hematoporfirina⁴

No entanto, nenhum destes procedimentos forneceu uma amostra pura de porfirina. Aproximadamente 30 anos mais tarde M. Nencki⁵ isolou a primeira amostra pura, preparando o hidrocloreto da hematoporfirina. Estes estudos iniciais marcaram o início da química das porfirinas, que hoje é pluridisciplinar, incluindo diversas áreas, nomeadamente a da medicina, e que continua em expansão.

Os macrociclos porfirínicos estão presentes em várias funções vitais como a respiração, a fotossíntese, o transporte de electrões e diversos processos enzimáticos sendo também usados na desintoxicação de drogas.^{6,7}

Na respiração está envolvida a hemoglobina que é um complexo proteico que contém quatro grupos heme (figura 16 B). Cada grupo heme é um complexo de ferro (II) que está coordenado aos quatro átomos de azoto do grupo planar da porfirina, a um átomo de azoto da proteína e a uma molécula de O₂ ou CO₂.

Cada molécula de hemoglobina pode transportar quatro moléculas de oxigénio, uma vez que possui quatro grupos heme. Uma das propriedades da hemoglobina é a sua capacidade para formar um complexo muito estável com o monóxido de carbono. Esta propriedade está na origem das mortes ocorridas em ambientes fechados nos quais houve queima de combustíveis (esquentadores, braseiras, etc.).

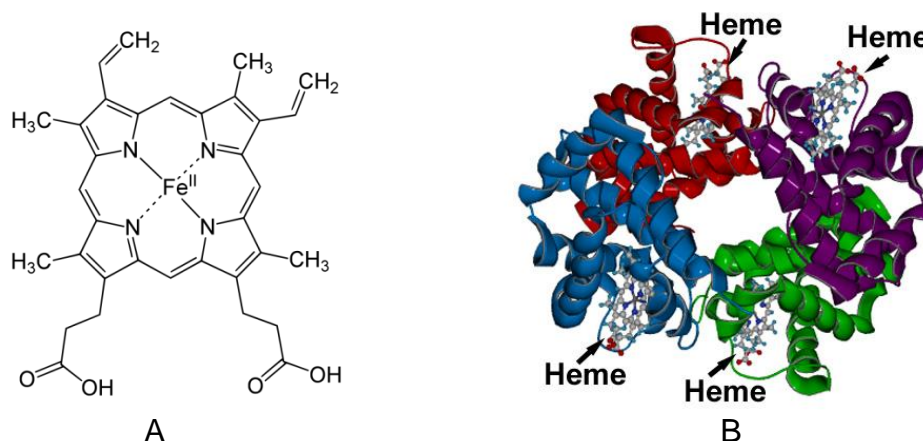


Figura 16 - Estruturas de: A - grupo heme⁸ B; B - hemoglobina⁹

Na fotossíntese, a luz é absorvida por centenas de moléculas de clorofila que transformam a energia luminosa na energia química necessária para converter o dióxido de carbono e água em hidratos de carbono essenciais à vida. A molécula de clorofila (figura 17) foi isolada por R. Willstätter, e este trabalho foi merecedor do Prémio Nobel da Química em 1915. A clorofila é responsável pela cor verde das plantas. Do ponto de vista estrutural as clorofilas são macrociclos tetrapirrólicos complexados com o ião magnésio (Mg²⁺). As clorofilas pertencem à classe das clorinas (macrociclos que possuem um anel porfirínico insaturado), no

entanto, têm uma outra característica estrutural distinta, possuem um quinto anel fundido com o macrociclo porfirínico.

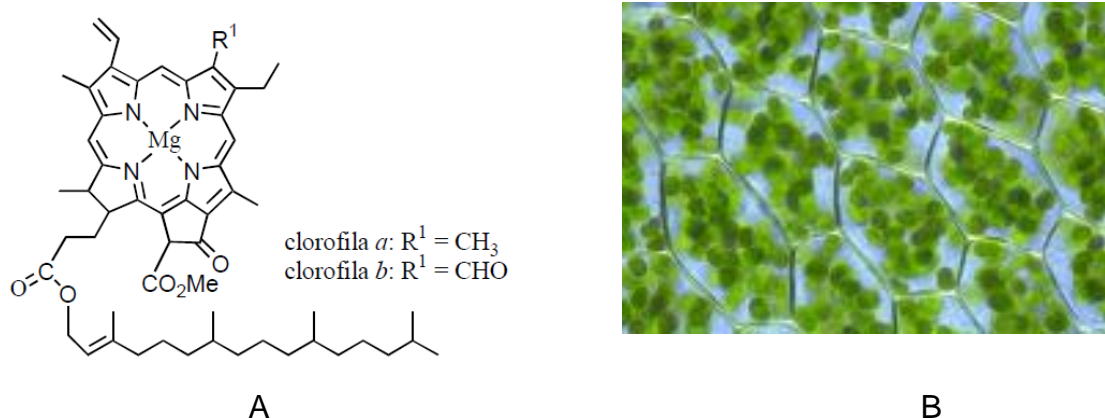


Figura 17 - A - estrutura da clorofila a e b; B - clorofila e cloroplastos¹⁰

A estrutura das porfirinas consiste em quatro unidades pirrólicas ligadas por quatro pontes metínicas. Esta estrutura esquelética foi proposta, em 1912, por W. Küster¹¹. No entanto, H. Fischer e R. Willstätter sugeriram que este sistema contendo anéis grandes não seria muito estável e propuseram outras estruturas, contendo um sistema com anéis menores, como sendo mais prováveis. Essas estruturas são apresentadas na figura seguinte.

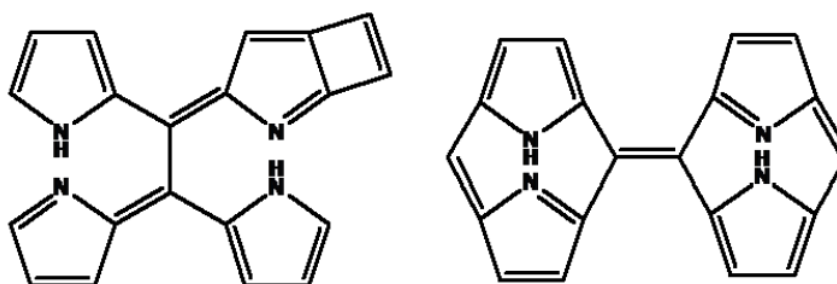


Figura 18 - Estruturas inicialmente propostas para as porfirinas⁴

O debate sobre a estrutura real da porfirina continuou até 1926, quando H. Fischer conseguiu obter a etioporfirina-III^{12,13} por uma via completamente sintética. Pouco tempo depois, o mesmo cientista, obteve a octametilporfirina (figura 19) usando dois métodos sintéticos distintos¹⁴ e conseguiu também

sintetizar a protoporfirina IX (figura 19). Na sequência destes estudos, a estrutura inicialmente proposta por W. Küster, em 1912, foi aceita como correspondendo à estrutura básica das porfirinas: quatro pirróis unidos por pontes metínicas.

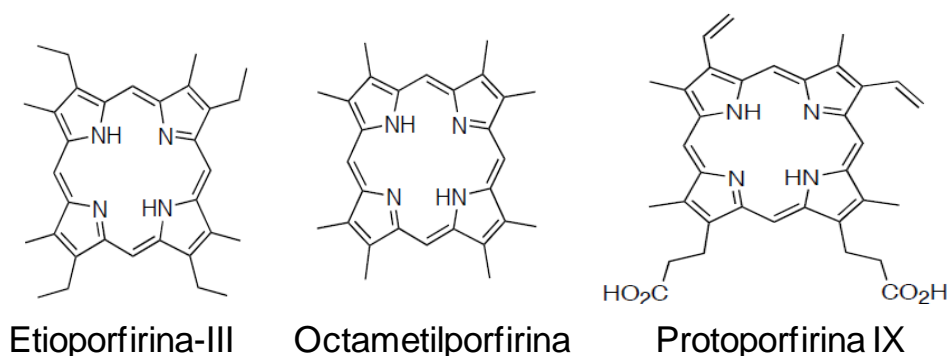


Figura 19 - Estruturas das primeiras porfirinas sintetizadas por Fischer

Foi também H. Fischer quem sugeriu um primeiro sistema de nomenclatura para estes compostos. No entanto, um outro sistema de nomenclatura foi proposto, mais recentemente, pela IUPAC.

No sistema proposto por Fischer¹⁵ os carbonos externos dos anéis pirrólicos são numerados de 1 a 8. Estas posições são também designadas por β -pirrólicas. As pontes metínicas são designadas por letras gregas, alfa (α), beta (β), gama (γ) e delta (δ) e são normalmente conhecidas por posições *meso* (figura 20).

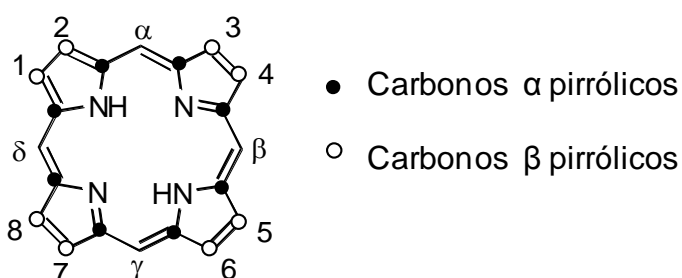


Figura 20 - Nomenclatura de Fischer para as porfirinas

Com o aparecimento de técnicas de análise, como por exemplo o RMN de ^{13}C e os Raios X, esta nomenclatura, na qual apenas eram identificadas algumas

das posições do macrociclo, deixou de ser a mais conveniente. A IUPAC¹⁵ recomendou um outro sistema onde todos os átomos pertencentes ao macrociclo são inequivocamente identificados por números. Convencionalmente os hidrogénios ligados aos átomos de azoto encontram-se nas posições 21 e 23. As designações *meso* e β -pirrólicas continuam a ser aceite neste sistema (figura 21).

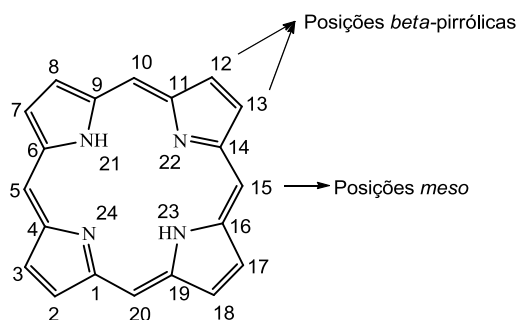


Figura 21 - Nomenclatura IUPAC para as porfirinas

Existem outros macrociclos tetrapirrólicos análogos às porfirinas, cuja principal diferença reside no grau de insaturação dos anéis pirrólicos. As porfirinas apresentam os seus anéis pirrólicos totalmente insaturados. As clorinas, grupo de compostos ao qual pertence a clorofila, atrás mencionada, são caracterizadas por apresentarem um dos anéis pirrólicos com dois carbonos sp^3 e as bacterioclorinas, assim como as isobacterioclorinas, são definidas estruturalmente pela presença de dois anéis pirrólicos com dois carbonos sp^3 . As diferenças entre estes três tipos de compostos são assinaladas na figura seguinte.

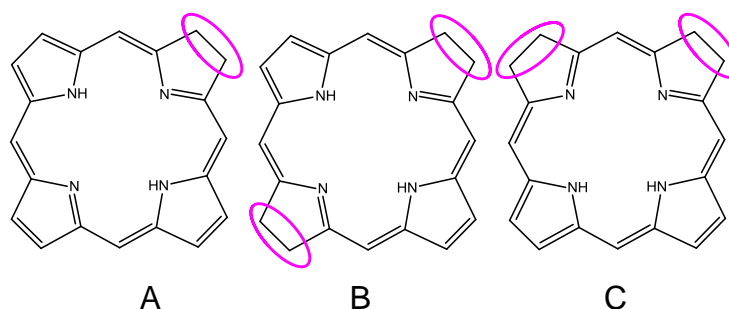


Figura 22 - Estruturas de: A - clorina; B - bacterioclorina; C - isobacterioclorina

2.1.2 - Propriedades físicas e químicas

O anel porfirínico contém vinte e dois electrões conjugados, no entanto o seu carácter aromático é assegurado apenas por dezoito deles, desta forma a porfirina pode perder uma ou duas ligações duplas e manter a sua aromaticidade. Dada a elevada conjugação dos macrociclos tetrapirrólicos, estes compostos são corados, e o seu espectro de visível é dominado por uma banda de absorção entre 390 e 425 nm, designada por “banda Soret” e por outras quatro bandas de absorção designadas por “bandas Q” (figura 23). A banda Soret é característica da deslocalização dos dezoito electrões π conjugados do macrociclo, o que significa que esta banda só desaparece quando o anel sofre abertura ou a conjugação é interrompida por qualquer outro motivo.

No entanto, o máximo de absorção da banda Soret (obtido em soluções diluídas) pode ser deslocado para comprimentos de onda mais elevados (desvio batocrómico) por formação de ligações π - π com outros sistemas aromáticos, incluindo ligações π - π intermoleculares no caso de soluções concentradas de porfirinas, nas quais se verifica auto-empilhamento destas.

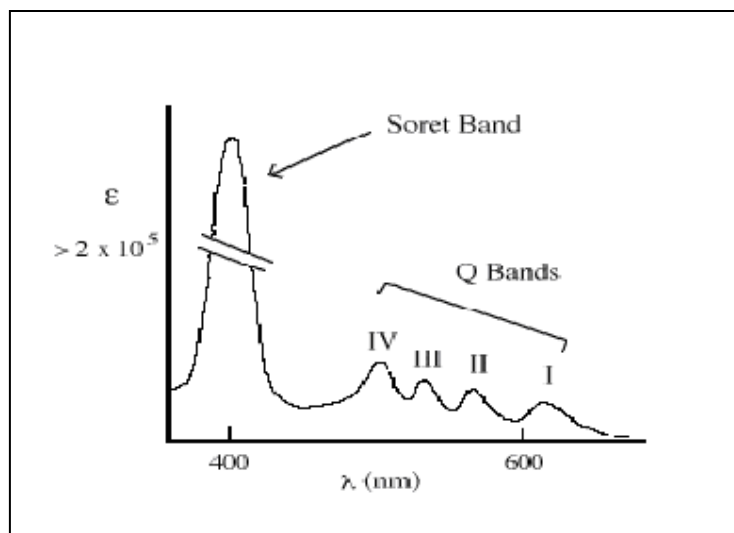


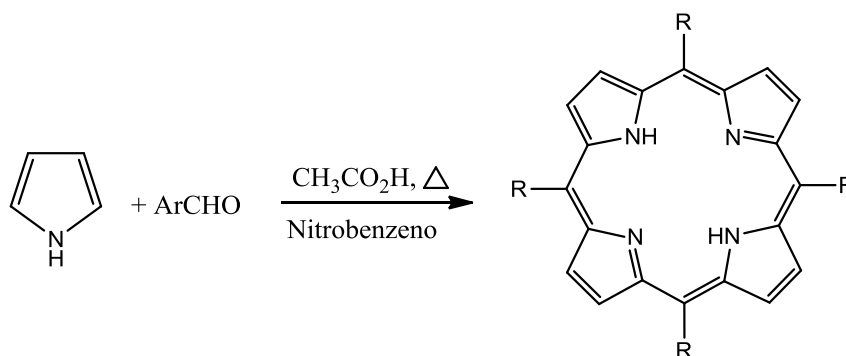
Figura 23 - Espectro de absorção de visível típico de uma porfirina não-metalada¹⁶

Os espectros de absorção dos derivados reduzidos, clorinas, bacterioclorinas e isobacterioclorinas apresentam diferenças significativas relativamente aos espectros de absorção das porfirinas ao nível da intensidade relativa das bandas Q. Nas clorinas, a banda Q1, apresenta-se mais intensa do que qualquer das bandas Q das porfirinas. Estas diferenças permitem distinguir claramente, usando a espectroscopia de UV-Vis, as porfirinas dos seus derivados reduzidos.

Outra das propriedades das porfirinas é a sua elevada capacidade de coordenação com uma grande variedade de metais. As porfirinas complexadas, nos átomos de azoto centrais, são designadas por metaloporfirinas. A complexação traduz-se em alterações no espectro de visível¹⁷, passando este a apresentar a “banda Soret” e apenas duas das “bandas Q” designadas por β e α .

2.1.3 - Preparação, reactividade e aplicações

Os procedimentos de preparação de porfirinas podem envolver modificação de porfirinas naturais ou decorrer segundo vias puramente sintéticas. Durante este trabalho foram apenas utilizadas porfirinas sintéticas *meso*-substituídas que podem ser sintetizadas por diversos métodos¹⁸, sendo o processo de síntese mais comum o que foi usado neste trabalho¹⁹: condensação do pirrol com um aldeído aromático (esquema 1).



Esquema 1

Por esta via podem obter-se porfirinas simétricas, se for usado um só aldeído, ou não simétricas, se forem usadas misturas de diferentes aldeídos. Na

síntese de porfirinas não simétricas, os diferentes produtos formados dependem da proporção de aldeídos presentes na mistura reaccional, bem como da reactividade dos mesmos.

Os macrociclos porfirínicos podem sofrer alterações na cavidade interior (nos átomos de azoto) ou na periferia do anel. Os átomos de azoto dos anéis pirrólicos apresentam propriedades ácido-base; em meio ácido os átomos de azoto são capazes de aceitar protões e formar espécies mono ou di-catiónicas. Por outro lado, em meio fortemente alcalino, os grupos NH podem desprotonar e formar espécies mono e di-aniónicas. As porfirinas são assim substâncias anfotéricas, apresentando quatro constantes de ácido-base (K_{H1} , K_{H2} , K_{H-1} e K_{H-2}).²⁰



Como foi referido anteriormente, as porfirinas são bons agentes complexantes. Um aspecto importante da metalacção é a activação das posições periféricas do anel. Complexos como os de magnésio (II) e zinco (II) tornam o macrociclo mais rico em electrões podendo este ser utilizado em reacções com oxidantes e electrófilos; no entanto, os complexos das porfirinas com estes metais são lábeis em meio ácido.

Relativamente às alterações na periferia do anel, as porfirinas podem sofrer reacções de substituição electrófila típicas de compostos aromáticos, como por exemplo a nitração, a halogenação, a sulfonação e a formilação. Estas reacções podem ocorrer quer nas posições *meso*, quer nas posições β do macrociclo porfirínico. Os carbonos α -pirrólicos raramente estão envolvidos em qualquer tipo de reacção.

A importância dos macrociclos porfirínicos é elevada uma vez que estes estão presentes, nas suas várias formas, reduzidas, oxidadas e complexadas, em várias funções vitais,²¹⁻²³ tais como, a respiração, a fotossíntese e em diversas reacções enzimáticas, como já foi referido. Para além da sua importância biológica, as áreas de aplicação destes compostos são muito vastas²⁴ podendo ser utilizados como catalisadores, transportadores artificiais de oxigénio, sensores químicos, semicondutores, agentes biocidas (fungicidas e insecticidas) e fármacos.^{25,26}

No caso da medicina, em aplicações ligadas ao tratamento de tumores, nomeadamente na terapia fotodinâmica^{27,28} (PDT), estes compostos têm uma importância especial, uma vez que têm a capacidade de se acumular preferencialmente em tecidos hiperproliferativos e de actuarem como agentes terapêuticos geradores de espécies tóxicas, quando irradiadas com luz.

Devido à sua grande versatilidade, são grandes as expectativas da indústria farmacêutica relativamente a estes compostos e verificam-se avanços constantes no desenvolvimento de novos fármacos.

2.2 - Redução de porfirinas catiónicas não-metaladas

A natureza electrolítica de alguns fenómenos que ocorrem durante o processo de Electrospray foi postulada na década passada^{29,30} e, não obstante alguma controvérsia inicial³¹, a ocorrência de reacções de oxidação-redução na fonte de Electrospray é, presentemente, consensual. Estas reacções dão-se durante os processos de nebulização/ionização da amostra e as que ocorrem no capilar (agulha) são responsáveis pelo balanço de cargas.^{29,30} Os processos de oxidação-redução em espectrometria de massa com ionização por Electrospray (ESI-MS) foram exaustivamente investigados por Van Berkel e colaboradores.³²⁻³⁶

O balanço de cargas atrás referido processa-se na agulha, através de reacções de redução, no modo de iões negativos e através de reacções de oxidação, no modo de iões positivos. No entanto, espécies formadas por processos de redução foram observadas por ESI-MS mesmo no modo de iões positivos. Nestas incluem-se as espécies formadas por redução por um electrão ($M^{2+} + e^- \rightarrow M^+$ e $M^{3+} + e^- \rightarrow M^{2+}$) de vários catiões não metalados, tais como iões piridínio diquaternários³⁷⁻³⁹ e *meso*-tris(*N*-alquilpiridil)porfirinas.⁴⁰ Usando também ESI-MS no modo de iões positivos, foram observadas reduções de *meso*-(tetraquis-*N*-alquilpiridil)porfirinas metaladas, que envolviam não apenas um, mas dois electrões ($M^{4+} + e^- \rightarrow M^{3+}$ e $M^{4+} + 2e^- \rightarrow M^{2+}$).⁴¹⁻⁴³

Ao analisarmos por ESI-MS, no modo de iões positivos, vários iodetos de *meso*-tris(*N*-metilpiridínio-4-il)porfirinas não metaladas, MI_3 , observámos, além do esperado ião M^{3+} , os iões M^{2+} , M^+ e $[M+2H]^+$, resultantes de processos de redução, envolvendo um, dois e mais electrões. Foi a primeira vez que se detectou a formação de espécies reduzidas através de processos envolvendo mais do que um electrão⁴⁴ para compostos catiónicos não-metalados, usando Electrospray no modo de iões positivos.

Das espécies reduzidas por nós observadas devemos salientar o caso específico da formação dos iões $[M+2H]^+$ por reacções de protonação e redução⁴⁴. Embora a redução de espécies multicarregadas com formação de iões $[M+nH]^+$ ($n>1$) tenha sido descrita no caso de espectrometria de massa com ionização por desadsorção, como FAB⁴⁵⁻⁴⁷ e MALDI⁴⁸, a sua formação durante os

processos de nebulização/ionização, no caso de ESI-MS, no modo de iões positivos, é, não só, muito pouco provável, mas também contra-intuitiva.

Entre as porfirinas catiónicas a *meso*-tetraquis(4-*N*-metilpiridil)porfirina, TMPyP (porfirina **14**), é sem dúvida, a mais conhecida. O espectro de massa do seu iodeto, MI₄, foi obtido pela primeira vez há quase três décadas, usando FAB, tendo sido observada apenas a formação de iões monocarregados,⁴⁹ como por exemplo $[M^{4+}+I^-+2e^-]^+$ e $[M^{4+}+4e^-+H^+]^+$. A técnica de desadsorção por plasma com Califórnio-252 foi também utilizada para estudar o cloreto da TMPyP, MCl₄,⁵⁰ tendo-se obtido, no modo de iões positivos, espécies monocarregadas, como por exemplo, $[M^{4+}+3Cl^-]^+$, $[M^{4+}+Cl^-+2e^-]^+$ e $[M^{4+}+3e^-]^+$.

Mais recentemente a técnica de ESI-MS, no modo de iões positivos, foi usada para estudar os isómeros posicionais da porfirina **14**, da *meso*-tetraquis(*N*-metilpiridínio-2-il)porfirina e outras *N*-metilpiridilporfirinas, na forma de sais com vários contra-íões (I⁻, CH₃COO⁻, TsO⁻=*p*-toluenossulfonato). Estes estudos revelaram a presença dos iões M⁴⁺, [M-H]³⁺, [M-alquilo]³⁺, [M-2H]²⁺ e [M-H-alquilo]²⁺, bem como de aductos com o contra-ião no caso de TsO⁻, como por exemplo $[M^{4+}+TsO^-]^3+$, $[M^{4+}+2TsO^-]^2+$ e ainda iões formados por redução por um electrão.^{40,41} Num outro estudo, também por ESI-MS detectou-se a formação de aductos das *meso*-tetraquis(*N*-alquilpiridil)porfirinas com o contra-ião cloreto, mas somente para os compostos com grandes cadeias alquílicas (grupos hexilo e octilo).⁴³

Estudos dos percloratos da porfirina **14** e da suas homólogas *meso*-tetraquis-(*N*-etilpiridínio-4-il)porfirina (porfirina **15**) e *meso*-tetraquis(*N*-propilpiridínio-4-il)porfirina usando um espectrómetro de massa MALDI-ToF foram também efectuados⁵¹, tendo sido identificados aductos das porfirinas reduzidas com o contra-ião, tais como $[M^{4+}+2ClO_4^-+e^-]^+$, $[M^{4+}+ClO_4^-+2e^-]^+$, $[2M^{4+}+2ClO_4^-+5e^-]^+$, $[2M^{4+}+3ClO_4^-+4e^-]^+$, bem como sinais correspondentes à porfirina reduzida $[M^{4+}+3e^-]^+$, $[M^{4+}+3e^-+3CH_3]^+$, $[M^{4+}+3e^-+2CH_3]^+$ e $[M^{4+}+3e^-+CH_3]^+$.

Espécies mono, dupla, tripla e quadruplamente carregadas de porfirinas catiónicas complexadas com Ru(II) e com o contra-ião CF₃SO₃⁻, foram observadas por ESI-MS, bem como os seus aductos com o dito contra-ião.⁵²

As espécies iónicas referidas nos estudos anteriores podem ser classificadas numa das seguintes categorias:

- aductos da porfirina com os contra-íões
- aductos da porfirina reduzida com os contra-íões
- íões formados por desprotonação
- íões formados por redução da porfirina e perdas de alquilo
- íões formados por redução da porfirina em processos envolvendo de um a quatro electrões.


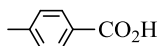
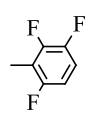
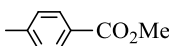
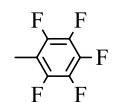
Nos estudos anteriores, além dos aductos com os contra-íões e dos íões correspondentes às porfirinas catiónicas, os outros íões observados, por ESI-MS, para as porfirinas na sua forma de bases livres, eram formados ou por reduções envolvendo apenas um electrão ou por desprotonação da porfirina. Reduções envolvendo dois, três e quatro electrões para porfirinas na sua forma de bases livres, tinham sido observadas apenas no caso de ionização por desadorkão: FAB, Cf-PDMS e MALDI-MS. No caso de ionização por Electrospray, reduções envolvendo mais do que um electrão tinham sido observadas exclusivamente para porfirinas catiónicas metaladas, nunca para bases livres.

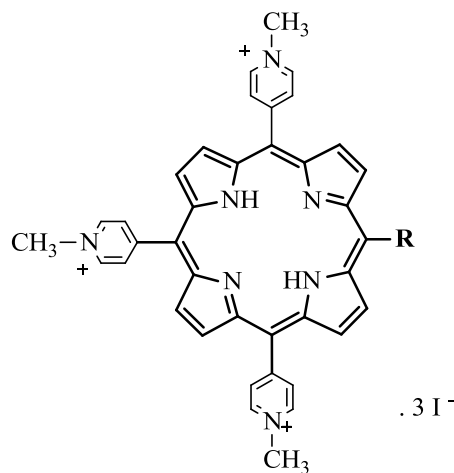
Com o objectivo de estudar as novas espécies detectadas e também para obter informação sobre os processos reaccionais envolvidos, usámos ESI-MS e espectrometria de massa tandem (ESI-MS/MS) e dois grupos distintos de porfirinas catiónicas.

Para facilitar a leitura e interpretação dos resultados obtidos, a discussão destes dois grupos de porfirinas será feita em dois subcapítulos distintos, A para as *meso*-tris(*N*-metilpiridínio-4-il)porfirinas e B para as *meso*-tetraquis(*N*-alquilpiridínio-4-il)porfirinas.

2.2A - meso-tris(*N*-metilpiridínio-4-il)porfirinas

O primeiro grupo de porfirinas estudado, MI_3 , é formado por um conjunto de meso-tris(*N*-metilpiridínio-4-il)porfirinas com o mesmo contra-íão (ião iodeto) e com o quarto substituinte *meso* diferente. No esquema 2 é apresentado o conjunto de meso-tris(*N*-metilpiridínio-4-il)porfirinas estudadas.

	R	Massa Molecular
9		662.30
10		706.29
11		716.27
12		720.31
13		752.26



Esquema 2

2.2A.1 - Estudos usando metanol como solvente

2.2A.1.1 - Espectros de massa

Nos espectros de massa de todas as meso-tris(*N*-metilpiridínio-4-il)porfirinas, MI_3 , foram observados os sinais correspondentes aos iões M^{3+} , M^{2+} e $[M-2H]^{2+}$. Para concentrações mais elevadas e a menores fluxos de introdução da amostra, os sinais mais abundantes correspondem aos iões M^{3+} , sendo os iões M^{2+} os segundos mais abundantes. Sinais correspondentes a agregados de iões,

tais como $[M^{3+}+2I]^{+}$ e $[M^{3+}+I]^{2+}$, não foram observados, tendo-se, por outro lado, observado os íons correspondentes às espécies reduzidas M^{+} e $[M+2H]^{+}$.

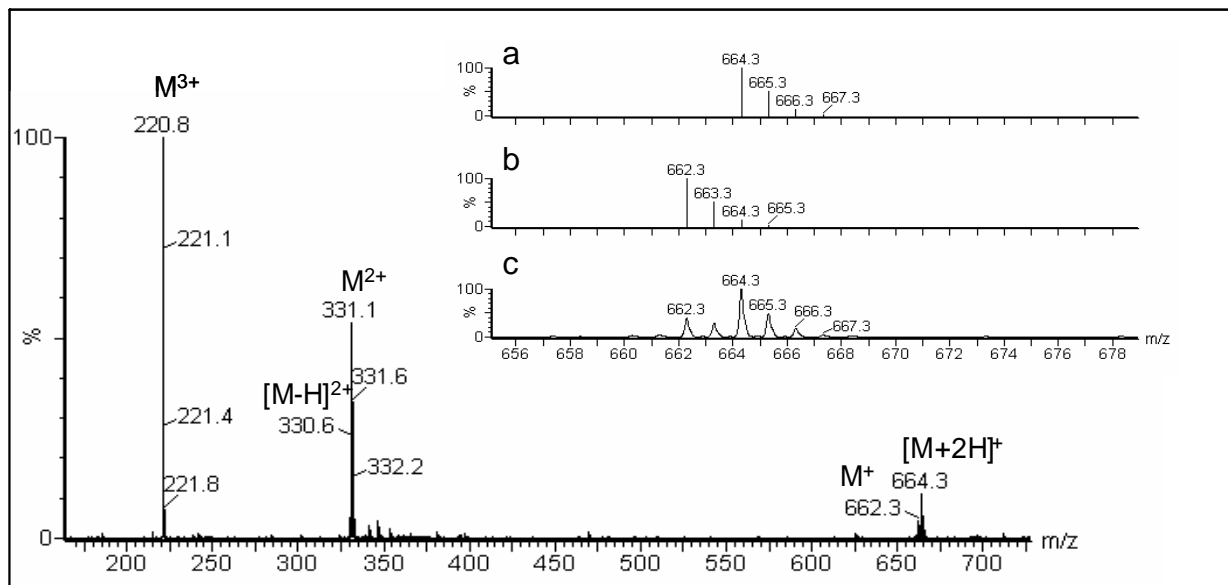


Figura 24 - Espectro de massa da porfirimina **9** (concentração de 3.5×10^{-6} M, fluxo de $10 \mu\text{L min}^{-1}$).

- a. padrão isotópico calculado do ião $[M + 2H]^{+}$;
- b. padrão isotópico calculado do ião M^{+} ;
- c. padrão experimental observado para o conjunto dos íons M^{+} e $[M + 2H]^{+}$.

Na figura **24**, é apresentado como exemplo, o espectro de massa da porfirimina **9**, esquema **2**, bem como os correspondentes padrões isotópicos experimentais e calculados, dos íons M^{+} e $[M+2H]^{+}$. Como pode ser observado na figura, o sinal da espécie monocarregada mais abundante corresponde ao ião $[M+2H]^{+}$.

Para confirmação da atribuição dos sinais nos espectros de massa anteriores, foi usado o programa de desconvolução MaxEnt3¹. Este programa desconvoluciona os sinais, partindo do princípio de que os íons positivos multicarregados são obtidos por protonação de moléculas neutras. Como foram usados sais (iodetos MI_3) para este conjunto de porfirinas, os íons M^{3+} já estavam

¹ Software da Micromass

pré-formados e os M^{2+} foram formados por redução. Por isso, na desconvolução dos iões M^{3+} e M^{2+} foram consideradas correcções de massa de 2 e 1 Da, respectivamente. Por exemplo para a porfirimina **9**, a massa monoisotópica de M é 662.30 Da. A desconvolução do sinal M^{3+} (m/z 220.80) dá origem a um sinal monocarregado com m/z 660.30 (em vez de 662.30 Da). Por sua vez, a desconvolução do sinal M^{2+} (m/z 331.20) dá origem também a um sinal monocarregado com m/z 661.30 (em vez de 662.30 Da).

Tendo estes pressupostos presentes, torna-se evidente, pela análise dos sinais desconvolucionados, que os iões predominantes no agregado duplamente carregado são a espécie reduzida M^{2+} , m/z 661.30, e não o ião desprotonado $[M-H]^{2+}$, m/z 660.25 (figura **25**).

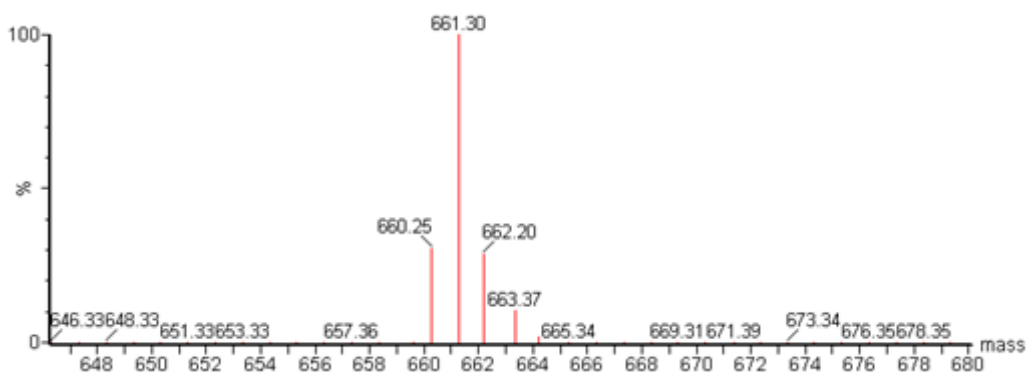


Figura 25 - Desconvolução dos iões $[M-H]^{2+}$ e M^{2+} para a porfirimina **9**

No caso da desconvolução de um sinal monocarregado não existe necessidade de correcção. Assim, a desconvolução dos iões M^+ e $[M+2H]^+$ da porfirimina **9** é apresentada na figura **26**. O sinal com m/z 662.30 corresponde ao ião M^+ e o sinal com m/z 664.31 corresponde a $[M+2H]^+$.

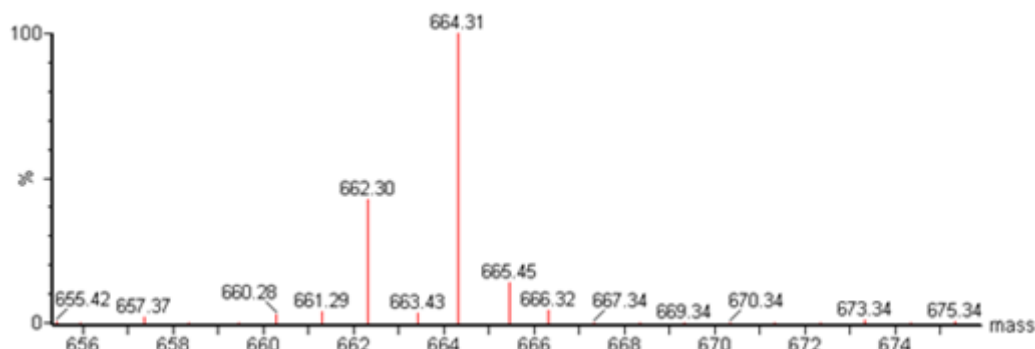


Figura 26 - Desconvolução dos iões M^+ e $[M+2H]^+$ para a porfirimina **9**

Por outro lado, pelo facto das abundâncias relativas das espécies reduzidas $[M+2H]^+$ variarem com a concentração da solução e com o fluxo de introdução da amostra, foram adquiridos os espectros de massa de soluções de porfirinas a três concentrações diferentes e a três fluxos diferentes, para cada concentração. Verificámos que, no caso das soluções com concentrações superior e intermédia, dentro da gama analisada, a abundância do ião $[M+2H]^+$ aumentava consideravelmente para baixos fluxos de introdução da amostra.

Na tabela 1 são apresentadas as abundâncias relativas (A.R.) dos iões M^+ e $[M+2H]^+$ (expressas pela média das percentagens da corrente iónica total (CIT), obtidas em três ensaios diferentes), para a porfirimina **9**, a diferentes concentrações e fluxos.

Tabela 1 - Abundâncias relativas dos iões M^+ e $[M+2H]^+$ (%CIT)* obtidas para a porfirimina **9**

Concentração (mol dm ⁻³)		Fluxo/ $\mu\text{L min}^{-1}$	M^+ (%CIT)	$[M+2H]^+$ (%CIT)
			Média (% desvio padrão)	Média (% desvio padrão)
1	8.70×10^{-7}	5	0,1 (9)	3 (14)
		7.5	0,1 (6)	3 (14)
		10	0,2 (6)	3 (24)
2	1.73×10^{-6}	5	0,8 (12)	19 (5)
		7.5	1 (13)	11 (15)
		10	1 (7)	8 (15)
3	3.47×10^{-6}	5	2 (15)	37 (9)
		7.5	3 (7)	33 (8)
		10	3 (9)	14 (14)

* CIT - corrente iónica total

Para uma visualização mais fácil das tendências de variação da CIT em função do fluxo de introdução da amostra e da concentração, estas são igualmente apresentadas nas figuras 27 e 28.

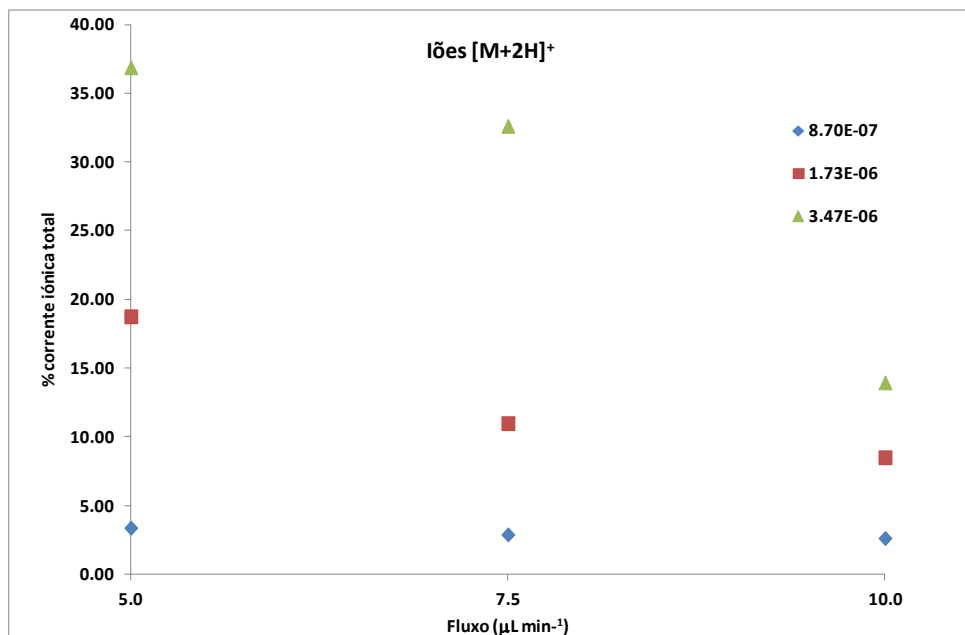


Figura 27 - Variação da corrente iónica de $[M+2H]^+$, como percentagem da corrente iónica total, em função do fluxo de introdução da amostra e da concentração

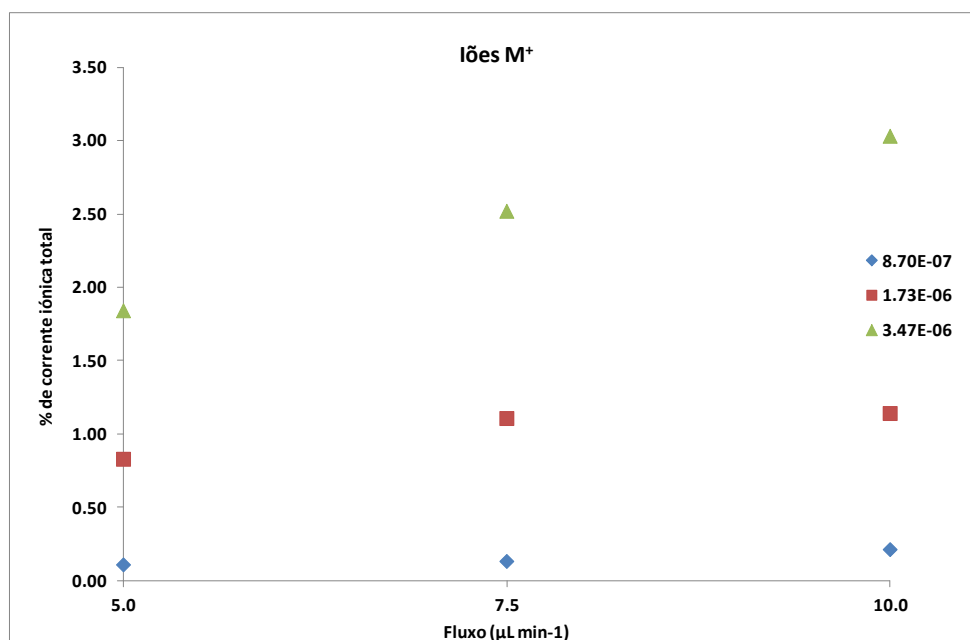


Figura 28 - Variação da corrente iónica de M^+ , como percentagem da corrente iónica total, em função do fluxo de introdução da amostra e da concentração

Como se pode constatar, a abundância de ambos os iões aumenta com o aumento da concentração, especialmente a abundância dos iões $[M+2H]^+$. Pode também observar-se que, tal como já foi referido anteriormente, a abundância dos iões $[M+2H]^+$ aumenta para fluxos de introdução baixos.

Nos espectros de massa obtidos para as diferentes porfirinas, verificou-se que a substituição de um grupo fenilo (porfirina **9**) por grupos arilo contendo substituintes electroattractores como 4-carboxifenil, 2,3,6 - trifluorofenil, 4-metoxycarbonilfenil e pentafluorofenil (porfirinas **10** a **13**) não afecta significativamente a abundância das espécies reduzidas M^{2+} , M^+ e $[M+2H]^+$.

2.2A.1.2 - Espectros de iões-produto (MS/MS)

Os espectros de iões-produto foram adquiridos em condições experimentais seleccionadas de modo a que todos os precursores (incluindo as espécies reduzidas) fossem formados com abundâncias relativas suficientemente elevadas (soluções de concentração 3.5×10^{-6} mol dm⁻³ e um fluxo de introdução de 10 µL min⁻¹). Para os iões-precursos M^{3+} , M^{2+} e M^+ , a voltagem do cone e a energia de colisão utilizados foram, respectivamente, 30 V e 25 eV. Quando os iões-precursos foram os iões $[M+2H]^+$, a voltagem do cone e energia de colisão utilizadas foram, respectivamente, 30 V e 45 eV. Na tabela **2** estão representados os iões produto obtidos para as espécies M^{3+} e M^{2+} .

A fragmentação dos iões M^{3+} e M^{2+} para todas as porfirinas estudadas ocorre predominantemente através de perdas de radical dos grupos substituintes do macrociclo, com formação de iões-produto dupla e triplamente carregados, respectivamente. Nas mesmas condições experimentais, a abundância relativa dos iões-precursos M^{3+} é maior do que a abundância relativa dos correspondentes iões-precursos M^{2+} . Os iões M^{2+} apresentam como via principal de fragmentação a perda de um radical metilo, com formação dos iões $[M-CH_3]^2+$.

A formação de iões-produto duplamente carregados a partir dos iões-precursos M^{3+} e dos iões-produto monocarregados a partir dos precursores M^{2+} ,

poderá ser atribuída a processos de separação de carga, os quais poderão ocorrer, quer por perda de um catião metilpiridínio, acompanhada pela perda radicais (H^\cdot , CH_3^\cdot), quer por perda de um catião metilo acompanhada pela perda de um radical metilpiridínio (ou de outros radicais).

Tabela 2 - Espectros de iões produto de M^{3+} , M^{2+} e $[M+2H]^+$ (m/z , abundância relativa, A.R. / %)

	Composto 9	Composto 10	Composto 11	Composto 12	Composto 13
Fragmentos	m/z (A.R./ %)				
$[M]^{3+}$ (ião precursor)	220.76 (100)	235.44 (100)	238.74 (100)	240.11 (100)	250.75 (100)
$[M - H - CH_3]^{3+}$	215.83 (50)	230.40 (14)	233.74 (33)	235.11 (20)	245.75 (45)
$[M - R - CH_3]^{3+}$	190.08 (20)	190.08 (11)	190.07 (19)	190.08 (14)	190.08 (44)
$[M-R]^{3+}$	195.09 (14)	195.09 (9)	195.07 (6)	195.09 (26)	195.09 (32)
$[M - C_6H_7N - CH_3]^{2+}$	277.11 (42)	299.10 (15)	304.08 (19)	306.12 (42)	322.09 (57)
$[M - H - C_6H_7N]^{2+}$	284.64 (50)	306.66 (13)	311.61 (10)	313.66 (27)	329.62 (40)
$[M]^{2+}$ (ião precursor)	331.15 (0.8)	353.09 (88)	358.12 (0.9)	360.14 (3.8)	376.12 (1.7)
$[M - CH_3]^{2+}$	323.64 (100)	345.57 (100)	350.61 (100)	352.63 (100)	368.62 (100)
$[M - 2CH_3 - H]^{2+}$	315.62 (7)	337.62 (53)	342.60 (5)	344.62 (4)	360.61 (5)
$[M - 2H - C_6H_7N]^+$	567.23 (0.3)	613.25 (19)	621.17 (0.2)	625.21 (0.4)	657.19 (0.9)
$[M - H - C_6H_7N - CH_3]^+$	553.22 (3)	597.21 (33)	607.16 (1.2)	611.20 (1.3)	643.18 (4)
$[M - H - C_6H_7N - 2 CH_3]^+$	538.19 (1.7)	582.17 (17)	592.14 (0.7)	596.17 (0.5)	628.16 (1.4)
$[M+2H]^+$ (ião precursor)	664.32 (1.2)	708.28 (11)	718.26 (9.8)	722.30 (1.8)	754.28 (3.3)
$[(M+2H) - CH_3]^+$	649.30 (5.8)	693.25 (44)	703.24 (33.4)	707.27 (10.9)	739.27 (15.2)
$[(M+2H) - 2CH_3]^+$	634.27 (100)	678.23 (100)	688.22 (100)	692.25 (100)	724.24 (100)
$[(M+2H) - 3CH_3]^+$	619.25 (11.7)	663.21 (14)	673.21 (4.4)	677.22 (9)	709.21 (6.3)
$[(M+2H) - C_6H_7N]^+$	571.27 (2.6)	615.24 (3)	625.22 (3.2)	629.25 (3.1)	661.25 (2.6)
$[(M+2H) - C_6H_7N - CH_3]^+$	556.24 (3.1)	600.19 (2.6)	610.19 (1.9)	614.23 (2.3)	646.21 (2.8)
$[(M+2H) - C_6H_7N - 2CH_3]^+$	541.21 (5.5)	585.18 (1.8)	595.17 (1.8)	599.21 (3.8)	631.16 (3.1)

O padrão de fragmentação dos iões M^+ é semelhante ao dos iões M^{2+} , e apresenta como via principal de fragmentação a perda de 30 Da, dando origem à formação da espécie $[M-2CH_3]^+$. A segunda espécie mais abundante é formada por perda de um radical metilo.

Os iões M^{2+} e M^+ são formados por redução, por um e dois electrões, a partir dos iões M^{3+} e são radicais hipervalentes, uma vez que nos iões M^{3+} os átomos de azoto do substituinte metilpiridínio têm os seus octetos completos. Os iões M^{2+} correspondem à porfirimina catiónica contendo um grupo substituinte neutro com um azoto hipervalente, e os iões M^+ correspondem à porfirimina catiónica

contendo dois grupos substituintes neutros, cada um com o seu azoto hipervalente. No presente caso, a presença do macrociclo com o seu extenso sistema π deslocalizado, estabiliza os radicais hipervalentes formados.

A presença de radicais hipervalentes semelhantes, para compostos em que átomos de azoto (ou fósforo), estão contidos em anéis aromáticos, como os formados por processos de redução por um electrão, de sais de amónio (e fosfónio) em fase gasosa, foi detectada por espectrometria de massa, pela primeira vez, em 1980⁵³ e está amplamente documentada.^{37,38,54-60} Contrariamente ao que acontece no caso de radicais hipervalentes de amónio em que o azoto tem quatro ligações simples e que são espécies transientes,⁶¹ os radicais hipervalentes em que o átomo de azoto está contido num anel aromático, são estabilizados por deslocalização parcial da densidade electrónica.

Apesar da estabilidade acrescida conferida pela presença do macrociclo porfirínico, no presente caso, a perda de radicais metilo é favorecida, uma vez que dá origem a iões nos quais o azoto apresenta a sua valência normal. A perda de radicais metilo, a partir dos iões M^{2+} e M^+ , conduz à formação de piridinas neutras (azoto com valência normal), nos grupos substituintes.

Na figura **29**, são apresentados, para valores de m/z superiores a 580, os espectros de iões-produto dos iões $[M+2H]^+$ das porfirinas **10**, **11** e **12**, adquiridos nas mesmas condições experimentais.

Os iões mais abundantes nos espectros de iões-produto das espécies $[M+2H]^+$ são, tal como acontecia no caso dos iões M^+ , formados por perda de um fragmento neutro com 30 Da: iões $[(M+2H)-2CH_3]^+$. Os segundos iões-produto mais abundantes são os iões $[(M+2H)-CH_3]^+$. Tal como no caso dos iões M^+ observam-se perdas de um substituinte metilpiridínio e perdas de um substituinte metilpiridínio acompanhadas por perdas de um e dois grupos metilo. Na zona de valores de m/z mais baixos, são observadas, com baixa intensidade, as espécies dupla e triplamente carregadas, $[M-CH_3]^2+$ e M^{3+} .

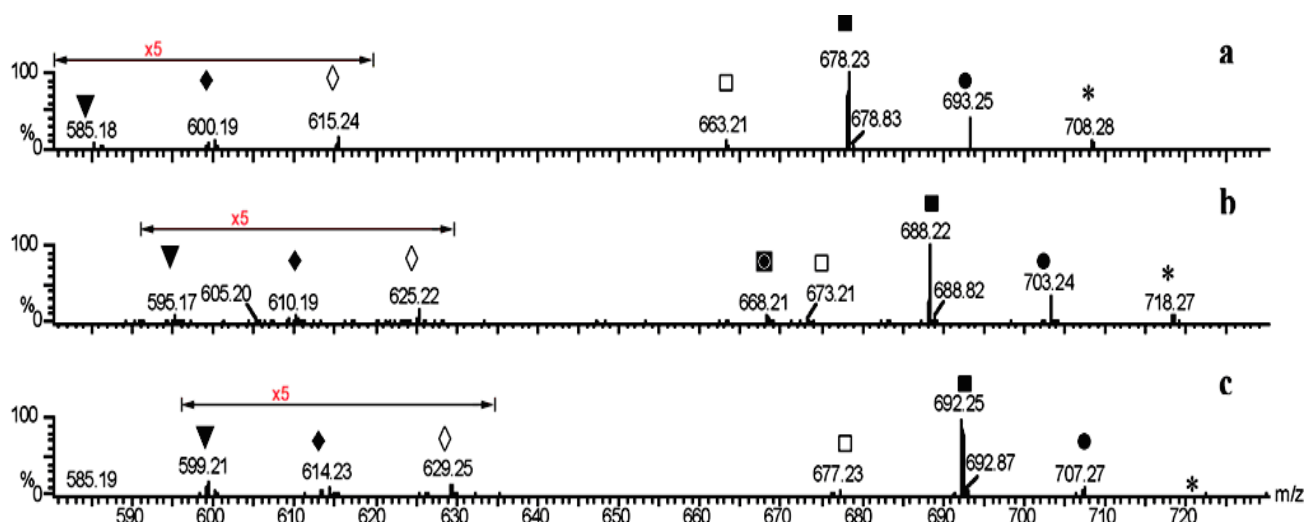
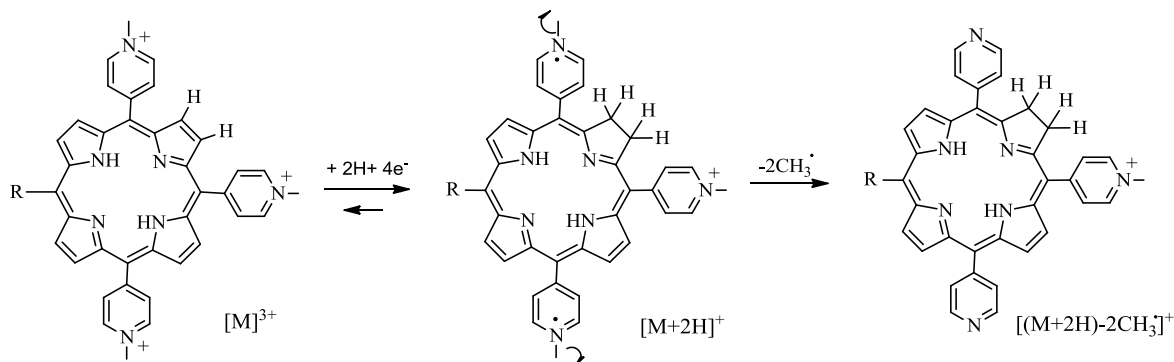


Figura 29 - Espectros de íões-produto dos íões $[M+2H]^+$

A - porfirina **10**; **B** - porfirina **11**; **C** - porfirina **12** (esquema 2)

* - ião-precursor $[M+2H]^+$; ● - $[(M+2H)-CH_3]^+$; ■ - $[(M+2H)-2CH_3]^+$;
 ◼ - $[(M+2H)-HF-2CH_3]^+$; □ - $[(M+2H)-3CH_3]^+$; ◇ - $[(M+2H)-C_6H_7N]^+$;
 ◆ - $[(M+2H)-C_6H_7N-CH_3]^+$; ▼ - $[(M+2H)-C_6H_7N-2CH_3]^+$

A redução das espécies M^{3+} a $[M+2H]^+$ envolve protonação e redução por vários electrões. Uma estrutura provável para os íões $[M+2H]^+$ é a estrutura de di-hidroporfirina (também conhecida como clorina). Os íões $[M+2H]^+$, tal como os íões M^+ , são espécies hipervalentes bi-radicalares, por isso a perda predominante de 30 Da, observada para ambos os íões, correspondente à perda de dois radicais metilo, é favorecida, uma vez que conduz à formação de duas piridinas neutras, nas quais os átomos de azoto se encontram na sua valência normal (esquema 3, para os íões $[M+2H]^+$).



Esquema 3

Embora o grau de purificação das porfirinas sintetizadas fosse bastante elevado, a sua contaminação com clorinas, quer formadas como impurezas no processo de síntese, quer formadas por redução após a dissolução da amostra, apesar de improvável, tinha que ser completamente excluída, por isso, foram obtidos os espectros de UV-visível de soluções das porfirinas em metanol, imediatamente a seguir à sua dissolução e após 24 h de repouso. Não se verificaram alterações significativas, na quarta banda Q (banda satélite número quatro da banda Soret ou B), atribuíveis à presença de clorina^{62,63} em nenhuma das amostras analisadas. Assim, podemos concluir que a redução da porfirina com formação da correspondente clorina, em soluções de metanol, não ocorreu antes da amostra ser sujeita ao processo de Electrospray.

Para confirmar a estrutura proposta para o ião $[M+2H]^+$, a clorina correspondente à porfirina **9**, foi sintetizada e caracterizada por várias técnicas nomeadamente RMN de 1H .

A comparação dos espectros de 1H RMN da porfirina **9** e da clorina correspondente mostra que no espectro de 1H RMN da porfirina **9** não estão presentes quaisquer sinais devido à clorina, como se pode verificar, nos espectros apresentados abaixo, figura **30**. Os sinais de 2-3.35 ppm correspondem aos solventes, não se encontrando presentes sinais característicos de formas reduzidas, como por exemplo, sinais na zona dos 4.2 ppm para $-CH_2CH_2-$ e na zona dos -1.3 ppm para os NH do interior do macrociclo.

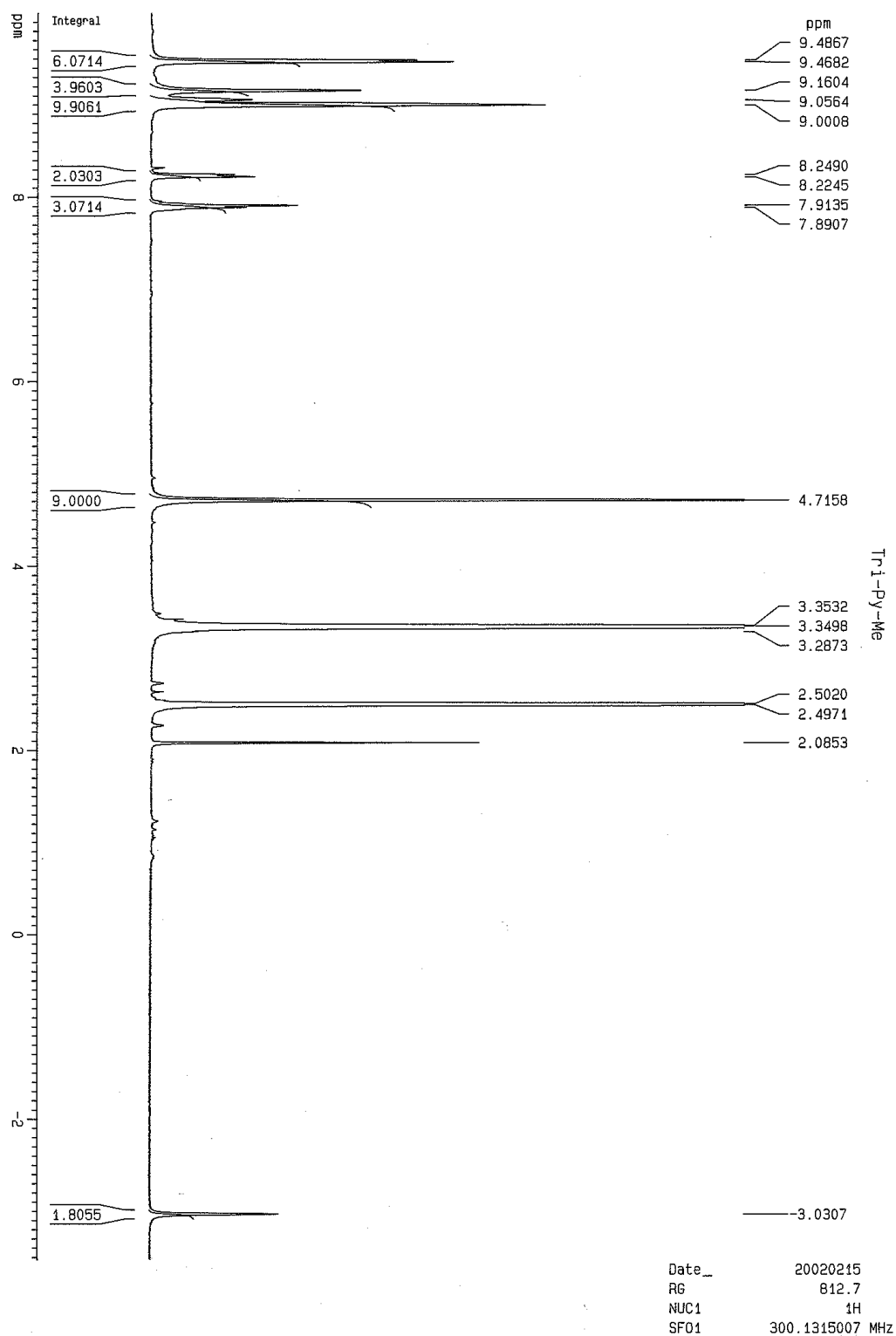


Figura 30 - Espectro de ^1H RMN da porfirina 9

Para salientar as diferenças observadas são apresentados nas figuras **31** e **32**, respectivamente, os espectros de ^1H NMR, na zona correspondente aos NH internos, característicos de uma porfirimina (neste caso a porfirimina **9**) e os correspondentes a uma mistura da mesma porfirimina com a correspondente clorina.

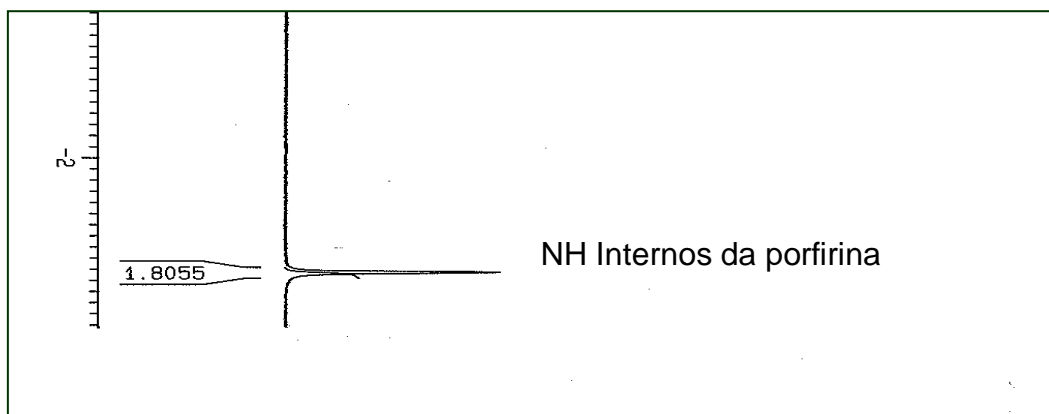


Figura 31 - Espectro parcial de ^1H NMR de uma porfirimina

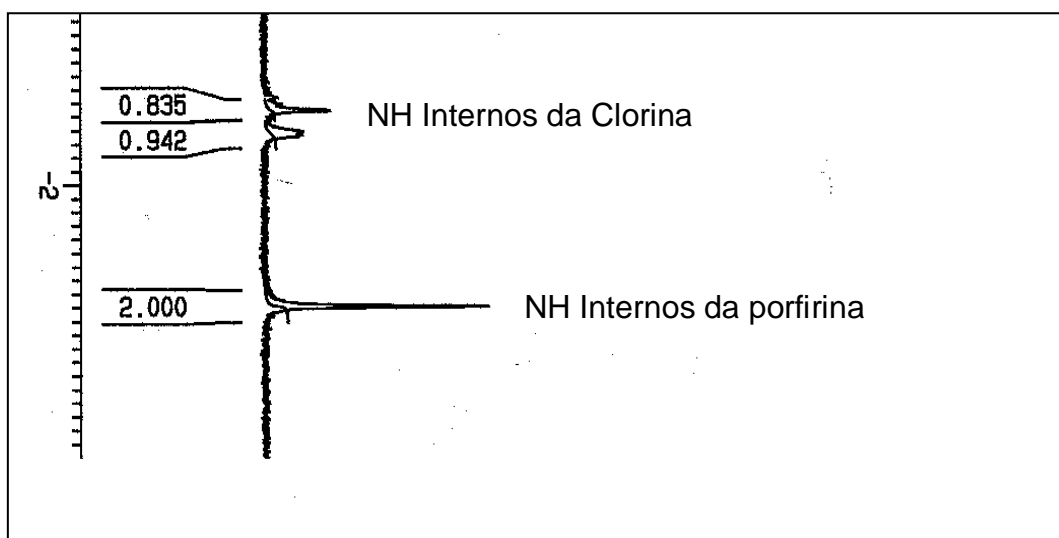


Figura 32 - Espectro parcial de ^1H NMR de uma mistura porfirimina/clorina

Na figura **33** podemos igualmente comparar os espectros de UV-Vis da porfirimina **9** e da clorina obtidos nas mesmas condições experimentais. O aumento da banda Q no caso da clorina, característico deste tipo de compostos, é facilmente detectável.

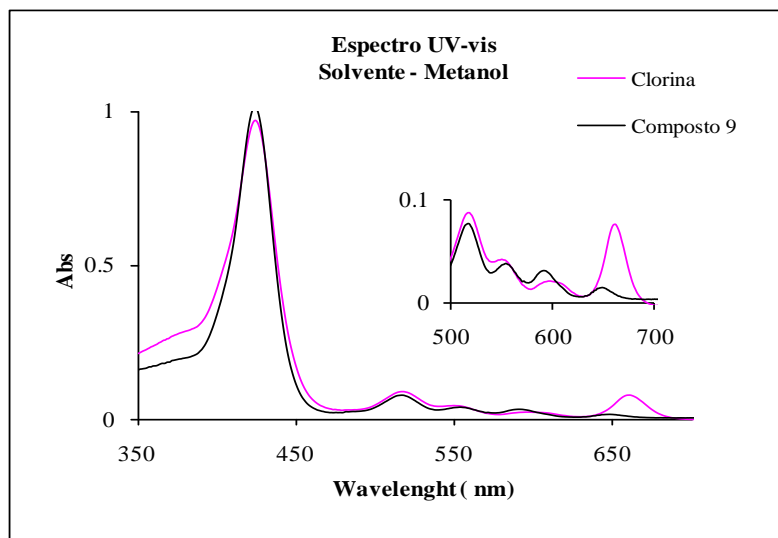


Figura 33 - Espectros de absorção da porfirina **9** e da clorina obtidos em metanol

Obtiveram-se também os espectros de massa e de iões-produto da clorina sintetizada, nas mesmas condições experimentais das adquiridas para a porfirina **9**, usando metanol como eluente.

Os espectros de massa obtidos para a porfirina **9** e para a clorina sintetizada são apresentados na figura **34** e são muito semelhantes. No caso da clorina, para além do ião esperado M'^{3+} , observou-se a formação de espécies resultantes de processos de redução, tendo sido identificados os iões M'^{2+} , M'^{+} e $[M'+2H]^+$. A espécie $[M'+2H]^+$ formada a partir da clorina corresponde muito provavelmente a uma dihidroporfirina (bacterioclorina ou isobacterioclorina).

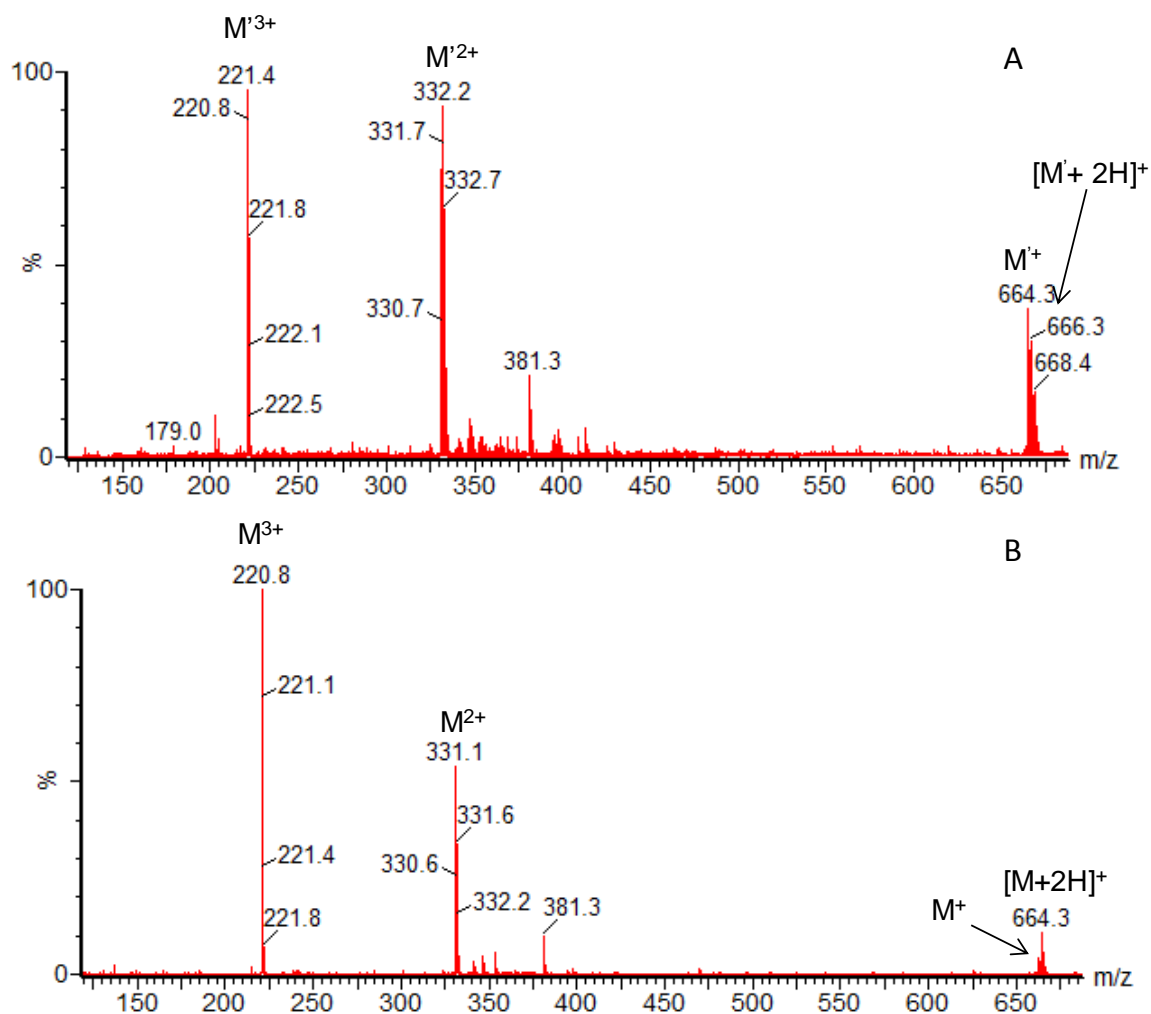


Figura 34 - Espectros de massa obtidos para A - clorina; B - porfirina **9**

Os espectro de iões-produto do ião M^+ da clorina (identificado como M^{1+}), m/z 664.3 e o espectro de iões produto do ião $[M+2H]^+$ da porfirina **9**, podem ser observados nas figuras **35** e **36**. Os espectros de massa são idênticos o que confirma a redução das porfirinas, nas respectivas clorinas, durante o processo de Electrospray.

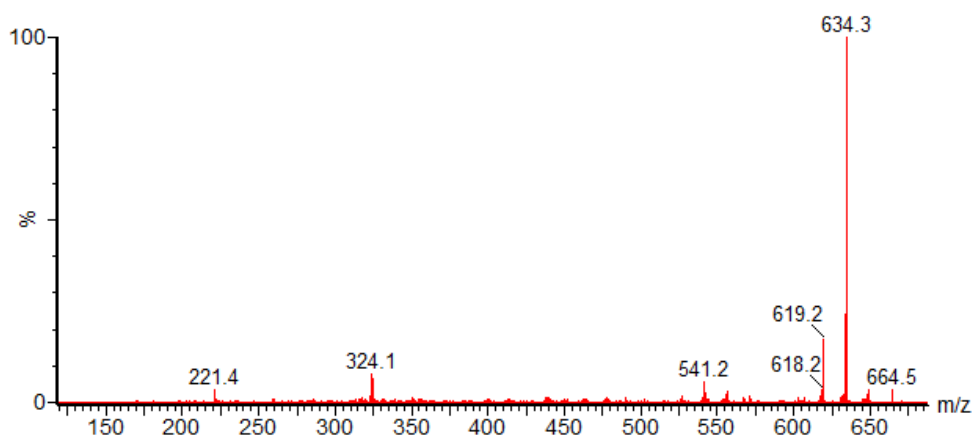


Figura 35 – Espectro de iões produto do ião M^+ da clorina

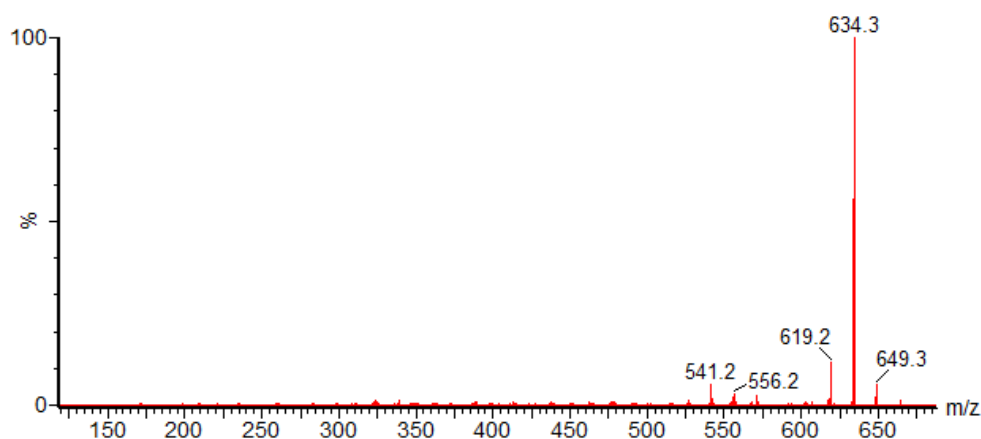


Figura 36 - Espectro de iões produto do ião $[M+2H]^+$ da porfirimina **9**

Como foi atrás referido, os processos de oxidação/redução que ocorrem no capilar (agulha metálica) do sistema de ionização, são importantes no processo de ionização global, sendo responsáveis pelo balanço de cargas. Em contrapartida, como também já foi referido, no modo de iões positivos, este balanço é alcançado através de processos de oxidação.^{29,30} Por conseguinte, as reduções observadas no modo de iões positivos não poderão ocorrer na agulha. A formação dos iões M^+ e $[M+2H]^+$ poderia então ocorrer, ou em solução, antes da introdução da amostra, o que foi descartado pela aquisição dos espectros de UV-vis atrás indicados, ou após a migração através da agulha, no cone de Raleigh ou nas gotículas. Deve-se no entanto acrescentar que a oxidação directa do eluente na agulha pode contribuir, indirectamente para o processo de redução do analito.

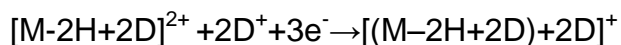
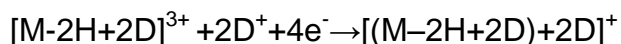
2.2A.2 - Estudos com outros solventes

2.2A.2.1 - Espectros de massa

Com o objectivo de compreender melhor o processo de formação dos iões $[M+2H]^+$, foram adquiridos espectros de massa de soluções das porfirinas noutros solventes: uma mistura de metanol e *N,N*-dimetilanilina (doador de electrões), acetonitrilo (solvente aprótico) e metanol deuterado. Quando os compostos foram dissolvidos na mistura metanol-dimetilanilina, não foram detectadas diferenças significativas nos espectros de massa obtidos o que, mais uma vez, indica que a redução não se dá antes do processo de Electrospray.

Quando foi usado o acetonitrilo não se detectou a formação dos iões $[M+2H]^+$, embora os iões M^{2+} e M^+ se tenham formado. A ausência dos primeiros, neste caso e a sua presença no caso de soluções contendo metanol, é indicativa da participação do metanol (solvente prótico) na formação das espécies $[M+2H]^+$. Para confirmar esta última hipótese, foram adquiridos espectros das soluções das porfirinas em metanol deuterado (CD_3OD). Nos espectros adquiridos nestas condições, foram observados:

- os iões triplamente carregados $[M-2H+2D]^{3+}$, formados por permuta dos hidrogénios centrais do ião M^{3+} por átomos de deutério.
- os iões duplamente carregados M^{2+} e $[M-2H+2D]^{2+}$, estes últimos formados, ou por permuta dos hidrogénios centrais do ião M^{2+} por átomos de deutério, ou por redução por um electrão dos iões $[M-2H+2D]^{3+}$
- os iões monocarregados M^+ , $[M-H+D]^+$ e $[(M-2H+2D)+2D]^+$; os segundos formado por substituição de um dos hidrogénios do ião M^+ por deutério e os terceiros formados por um dos, ou pelos dois, processos seguintes:



Como foi referido atrás, esta foi a primeira vez que foi observada, usando Electrospray no modo de iões positivos, a formação de espécies reduzidas por processos envolvendo 3 e 4 electrões. É também de salientar que os processos de redução em Electrospray no modo de iões positivos descritos até ao presente e que envolveram reduções por um e dois electrões, ocorreram exclusivamente para espécies metaladas.

2.2A.2.2 - Espectros de iões-produto

Os espectros de iões-produto dos iões $[M+2H]^+$ e $[(M-2H+2D)+2D]^+$, adquiridos nas mesmas condições experimentais, são semelhantes para todas as porfirinas. Na figura 37 e na tabela 3 são apresentados os principais iões-produto obtidos dos iões $[M+2H]^+$ e $[(M-2H+2D)+2D]^+$, obtidos para a porfirina 13, esquema 2.

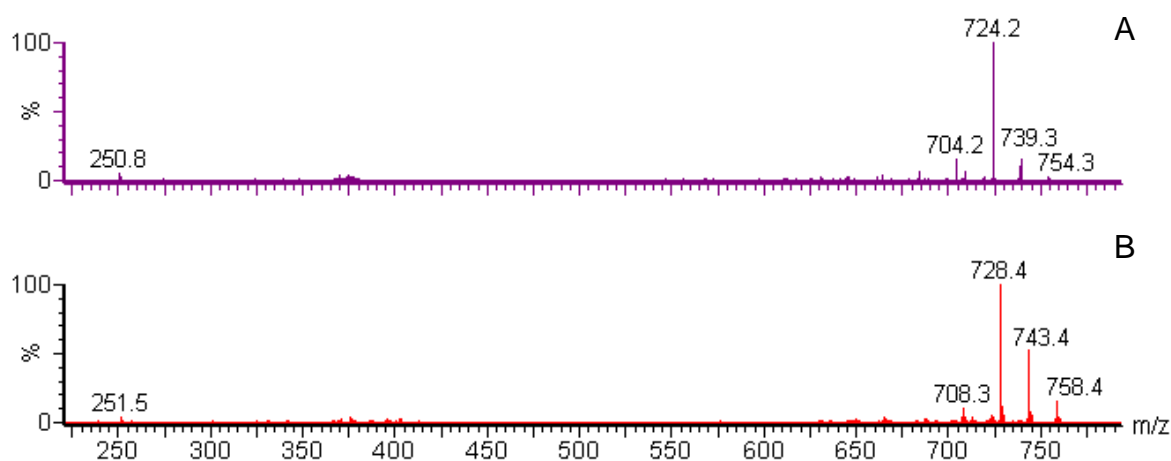


Figura 37 - Espectro de iões-produto obtidos para a porfirina 13, dos iões A - $[M+2H]^+$; B - $[(M-2H+2D)+2D]^+$

Tabela 3 - Principais íões-fragmento obtidos para os íões $[M+2H]^+$ e $[(M-2H+2D)+2D]^+$ para a porfirina **13**

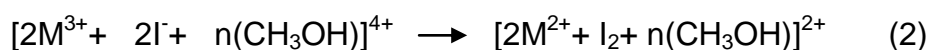
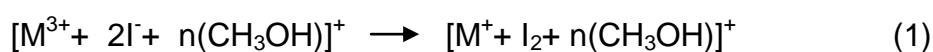
Identificação dos íões	Porfirina 13 em CH ₃ OH		Porfirina 13 em CD ₃ OD	
	<i>m/z</i>	A.R. (%)	<i>m/z</i>	A.R. (%)
Íões-precusores				
$[M+2H]^+ / [(M-2H+2D)+2D]^+$	754.3	3	758.4	15
$[(M+2H)-CH_3]^+ / [(M-2H+2D)+2D-CH_3]^+$	739.3	15	743.4	52
$[(M+2H)-2CH_3]^+ / [(M-2H+2D)+2D-2CH_3]^+$	724.2	100	728.4	100
$[(M+2H)-3CH_3]^+ / [(M-2H+2D)+2D-3CH_3]^+$	709.2	6	713.3	4
$[(M+2H)-HF-2CH_3]^+ / [(M-2H+2D)+2D-HF-2CH_3]^+$	704.2	16	708.3	10
$M^{3+} / [M-2H+2D]^{3+}$	250.8	5	251.5	4

Como foi descrito anteriormente, os íões -produto mais abundantes são formados pela perda de dois grupos metilo e os segundos mais abundantes são os íões formados pela perda de um grupo metilo. Íões exclusivamente característicos desta porfirina como os formados por perda de dois grupos metilo e uma molécula de HF estão também presentes. A formação de espécies triplamente carregadas com *m/z* 250.75 e 251.46, íões M^{3+} e $[M-2H+2D]^{3+}$, pode ocorrer por “charge stripping” a partir dos respectivos precursores, $[M+2H]^+$ e $[(M-2H+2D)+2D]^+$, e embora ocorra com abundâncias relativas baixas, reforça a semelhança dos processos de fragmentação daqueles e, conseqüentemente, das suas estruturas.

Analisando todo o conjunto de resultados obtido, parece provável que os electrões responsáveis pelos processos de redução, sejam provenientes dos contra-íões iodeto (I^-). Embora nas condições experimentais utilizadas, a formação de agregados, tais como $[M^{3+}+2I^-]^+$ e $[M^{3+}+I^-]^{2+}$ não tenha sido detectada, os íões M^+ e M^{2+} podem resultar de transferência de electrões, a partir dos aniões iodeto, nos agregados contra-ião/solvente. Se admitirmos que esses agregados são formados no processo de solvatação, de forma semelhante ao

descrito para compostos dicatiónicos,⁶⁴ a transferência de electrões do iodeto para o catião porfirínico levaria à formação das espécies reduzidas M^+ e M^{2+} .

Os agregados poderão existir nas gotículas como pares iónicos solvatados com ligações fortes (tight ion pair clusters)³⁷, como por exemplo os agregados $[M^{3+}+2I^-+n(CH_3OH)]^+$ e $[M^{3+}+I^-+n(CH_3OH)]^{2+}$. A redução poderá ocorrer enquanto estes agregados se encontram em regiões da fonte com pressões relativamente altas⁶⁵. Assim, é provável que a formação dos iões M^+ e M^{2+} ocorra dentro de agregados deste tipo, sem alteração da carga global, conforme indicado abaixo:



No caso dos iões $[M+2H]^+$, o aumento da abundância para menores fluxos de introdução da amostra e a formação dos iões $[(M-2H+2D)+2D]^+$ quando foi usado metanol deuterado, confirma o papel fundamental do solvente na formação das clorinas e aponta para um processo de redução diferente dos anteriores. É provável que a formação das clorinas ocorra dentro de agregados iónicos com composições semelhantes, mas arranjos internos diferentes dos indicados acima, como por exemplo pares iónicos solvatados com ligações fracas (loose ion pair clusters)³⁷, tais como $[M^{3+}+n(CH_3OH)+2I^-]^+$ e $[M^{3+}+n(CH_3OH)+I^-]^+$, nos quais as porfirinas e os contra-íões estão separados por moléculas de solvente. A transferência de electrões, de fragmentos moleculares e mesmo de protões, no interior de agregados deste tipo foi detectada em agregados de catiões metálicos com solventes apróticos⁶⁶. A transferência de protões será, por isso, muito mais provável no caso do metanol (solvente prótico). Se houver formação de pares iónicos solvatados com ligações fracas, no caso das soluções das porfirinas em metanol, a formação da clorina poderá ocorrer por transferência de protões e de electrões do solvente.

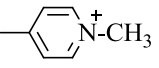
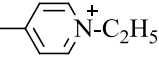
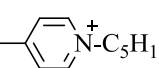
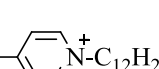
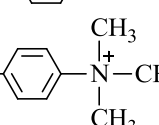
O facto de a clorina se formar com maior abundância quando são usados fluxos de introdução da amostra mais baixos é consistente com a hipótese de a primeira etapa do processo geral de redução ser uma reacção de protonação. A

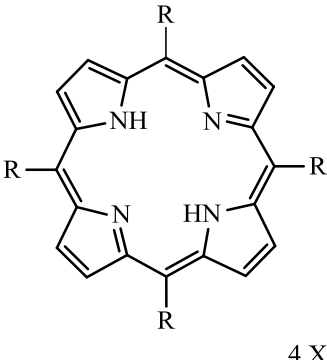
diminuição do pH da solução, em ESI no modo de iões positivos, causada por reacções de oxidação do solvente na agulha, mais acentuada para caudais inferiores, foi já anteriormente relatada⁶⁷. Assim, se assumirmos que o metanol pode ser oxidado na agulha, os protões, formados como produtos desta oxidação, estarão disponíveis em solução. Um maior número de protões será então produzido, quando foram usados fluxos mais baixos e a reacção de formação da clorina dar-se-á numa maior extensão (maior abundância das espécies $[M+2H]^+$). A fonte de electrões, presentes no processo de redução, poderá ser ou os contra-íões iodeto ou os iões metóxido, formados nos agregados, por desprotonação do metanol.

2.2B - meso-tetraquis(*N*-alquilpiridínio-4-il)porfirinas

A fim de investigar mais profundamente as hipótese avançadas: formação de radicais hipervalentes e papel dos adutos na formação das espécies reduzidas e ainda a influência do comprimento das cadeias dos substituintes *N*-alquilpiridil (metil, etil, pentil ou dodecil) e dos contra-íões (Br^- , I^- ou TsO^-) na formação das espécies reduzidas, foi estudado, por ESI-MS e ESI-MS/MS, no modo de íões positivos, um segundo conjunto de sais de meso-tetraquis(*N*-alquilpiridínio-4-il) porfirinas, MX_4 , contendo 4 grupos alquilo idênticos em cada porfirina, mas diferentes de porfirina para porfirina e com diferentes contra-íões (esquema 4).

De forma a ser também possível comparar a influência, no processo de redução, do tipo de átomos de azoto dos substituintes, N inserido num anel aromático e N num grupo amónio quaternário com 4 ligações simples, foi ainda incluído, neste conjunto, o *p*-toluenossulfonato (TsO^-) da meso-tetraquis-(4-trimetilamóniofenil)porfirina, TTMAPP, porfirina **18**.

	R	Massa Molecular	X
14		678.32	I^- ou TsO^-
15		734.38	Br^-
16		902.57	I^-
17		1296.01	Br^-
18		846.51	TsO^-



. 4 X⁻

Esquema 4

2.2B.1 - Espectros de massa

2.2B.1.1 - *N*-alquilpiridilporfirinas

Os espectros de massa das *N*-alquilpiridilporfirinas, porfirinas **14** a **17**, esquema **4**, adquiridos usando metanol como solvente, apresentaram sinais com baixa abundância relativa, correspondentes aos iões M^{4+} , bem como sinais correspondentes aos iões $[M^{4+}-H^+]^{3+}$ e $[M^{4+}+e^-]^{3+}$. Outras espécies triplamente carregadas, como o $[M^{4+}-\text{alquilo}^+]^{3+}$, foram também identificadas. Na figura **38** são apresentados, para a porfirina **15**, os padrões isotópicos experimental e calculado correspondentes aos iões $[M^{4+}-H^+]^{3+}$ (m/z 244.5) e $[M^{4+}+e^-]^{3+}$ (m/z 244.8).

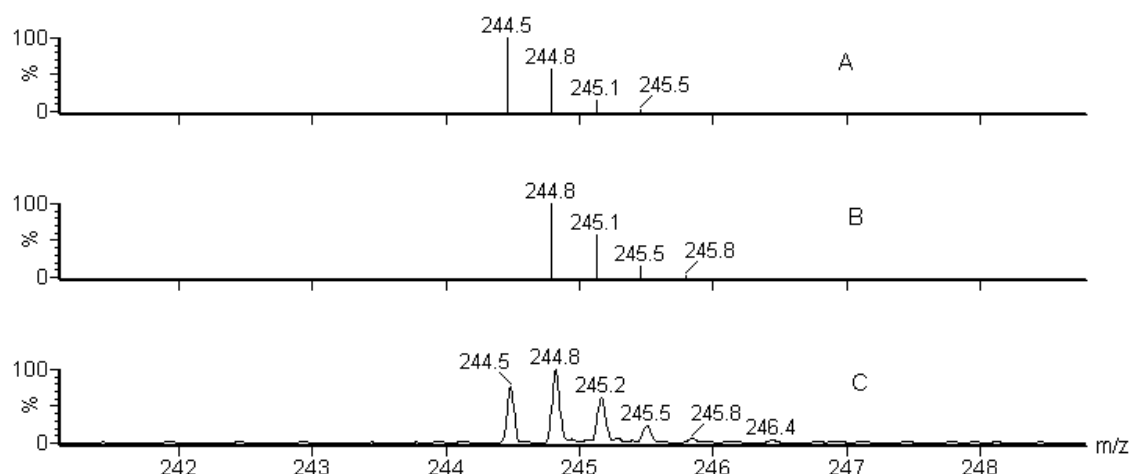


Figura 38 - Padrões isotópicos dos iões $[M-H]^{3+}$ e $[M]^{3+}$ para a porfirina **15**:

A - $[M-H]^{3+}$ calculado; B - $[M]^{3+}$ calculado; C - experimental

Sinais correspondentes aos iões duplamente carregados $[M^{4+}-2H^+]^{2+}$, $[M^{4+}+e^-+H^+]^{2+}$ e $[M^{4+}+2e^-]^{2+}$ foram também observados, para todas as porfirinas, sendo os iões $[M^{4+}+2e^-]^{2+}$ os mais abundantes para as três primeiras porfirinas. No caso da porfirina **17**, para além daqueles, foi também observada, a espécie $[M^{4+}+4e^-+2H^+]^{2+}$ que é, das quatro espécies iónicas, a mais abundante. Os iões $[M^{4+}-2\text{alquilo}^+]^{2+}$ foram também observados, excepto no caso da porfirina **15**. Por outro

lado, os iões $[M^{4+}-2\text{alquilo}^+-\text{alceno}]^{2+}$ foram apenas observados para as porfirinas **16** e **17**.

Para todas as *N*-metilpiridilporfirinas estudadas, detectou-se a formação das espécies reduzidas $[M^{4+}+5e^-+2H^+]^+$, tendo-se verificado que a abundância relativa destas diminuía com o aumento do comprimento da cadeia do substituinte alquílico, ou seja da tetrametilpiridilporfirina para a tetradodecilpiridilporfirina. No caso da porfirina **14**, os iões $[M^{4+}+5e^-+2H^+]^+$ são observados para os dois sais analisados, I^- e $p\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3^-$. Para as porfirinas **16** e **17**, foram também observados sinais correspondentes aos iões $[M^{4+}-3\text{alquilo}^+]^+$.

Os espectros de massa das diferentes *N*-alquilpirilporfirinas foram também adquiridos utilizando metanol deuterado como solvente, tendo-se detectado a formação dos homólogos deuterados de todas as espécies obtidas em metanol não deuterado, como por exemplo, as espécies reduzidas $[(M^{4+}-2H+2D)+4e^-+2D^+]^{2+}$ e $[(M^{4+}-2H+2D)+5e^-+2D]^+$.

Da análise dos espectros de massa obtidos constata-se que as diferentes *N*-alquilpirilporfirinas têm um comportamento em fase gasosa muito semelhante sendo a formação das espécies reduzidas $[M^{4+}+e^-]^{3+}$ e $[M^{4+}+2e^-]^{2+}$ uma das principais características observadas. Como já foi indicado anteriormente, estas espécies reduzidas são radicais aromáticos hipervalentes, e são espécies estáveis, contrariamente aos radicais hipervalentes formados a partir de compostos de amónio em que o azoto apresenta 4 ligações simples, que são espécies transientes⁶¹.

No presente caso, a formação de espécies reduzidas não é dependente da estrutura do contra-íão presente, uma vez que as espécies reduzidas são observadas para a porfirina **14** quando estão presentes quer o contra-íão I^- quer o contra-íão $p\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3^-$.

Outra característica interessante observada foi a formação das espécies reduzidas $[M^{4+}+4e^-+2H^+]^{2+}$ e $[M^{4+}+5e^-+2H^+]^+$. A formação destas espécies é indicativa do envolvimento do solvente no processo de redução. Este facto foi confirmado pela formação dos iões deuterados correspondentes aos anteriores, quando foi utilizado metanol deuterado. O envolvimento provável do solvente no processo de redução foi postulado por nós⁴⁴ e discutido na primeira parte deste

capítulo, no caso da formação dos iões $[M^{3+}+4e^{-}+2H^{+}]^{+}$ para os iodetos das *meso*-tris(*N*-metilpiridil)porfirinas. De notar ainda que espécies protonadas análogas tais como $[M^{4+}+2H^{+}]^{6+}$ e $[M^{4+}+2e^{-}+2H^{+}]^{4+}$ foram detectados em soluções ácidas do iodeto de tetrametilpiridilporfirina (porfirina **14**), tendo sido identificados como processos de redução electroquímica.⁶⁸

Estudos prévios⁶⁹ mostraram que, quando uma solução é submetida a um processo de Electrospray, no modo de iões positivos, a acidez das gotículas pode sofrer aumentos de uma ordem de grandeza (por exemplo de 10^3 para 10^4 mol dm^{-3}). Constatou-se também que a diminuição do pH observada no modo de iões positivos, ocorre ao longo do eixo de nebulização.⁷⁰ As considerações anteriores reforçam a hipótese proposta no presente trabalho de um processo de redução envolvendo protonação das porfirinas nas gotículas.

2.2B.1.2 - 5,10,15,20-tetraquis(4-trimetilamóniofenil)porfirina

A principal diferença observada no espectro de massa da porfirina **18**, esquema 4), quando comparado com os espectros das *N*-alquilpiridilporfirinas, é a ausência das espécies reduzidas $[M^{4+}+e^{-}]^{3+}$, $[M^{4+}-2H^{+}]^{2+}$, $[M^{4+}+e^{-}+H^{+}]^{2+}$, $[M^{4+}+2e^{-}]^{2+}$, $[M^{4+}+4e^{-}+2H^{+}]^{2+}$ e $[M^{4+}+5e^{-}+2H^{+}]^{+}$. Outras diferenças são a formação de aductos com o contra-íão, como por exemplo, os iões $[M^{4+}+X^{-}]^{3+}$ (m/z 339.2), $[M^{4+}+2X^{-}]^{2+}$ (m/z 594.2) e $[M^{4+}+X^{-}-CH_3^{+}]^{2+}$ (m/z 501.2), bem como a observação de iões com quatro cargas positivas, formados por perda de radicais metilo, tais como $[M^{4+}-CH_3]^{4+}$ (m/z 207.9) e $[M^{4+}-2CH_3]^{4+}$ (m/z 204.1). O ião M^{4+} (m/z 211.6) é a segunda espécie mais abundante. Os iões $[M^{4+}-H^{+}]^{3+}$ (m/z 281.8) e $[M^{4+}-CH_3^{+}]^{3+}$ (m/z 277.1), são também observados, correspondendo este último ao pico base (figura 39, espectro B).

Na figura 39 são apresentados, como exemplo, os espectros de massa das porfirinas **15** e **18**, como exemplo de espectros de massa obtidos para as porfirinas com substituintes em que o átomo de azoto faz parte de um anel aromático e em que o átomo de azoto forma 4 ligações simples, respectivamente.

Os principais iões observados nos espectros de massa de todas as porfirinas são apresentados na tabela 4.

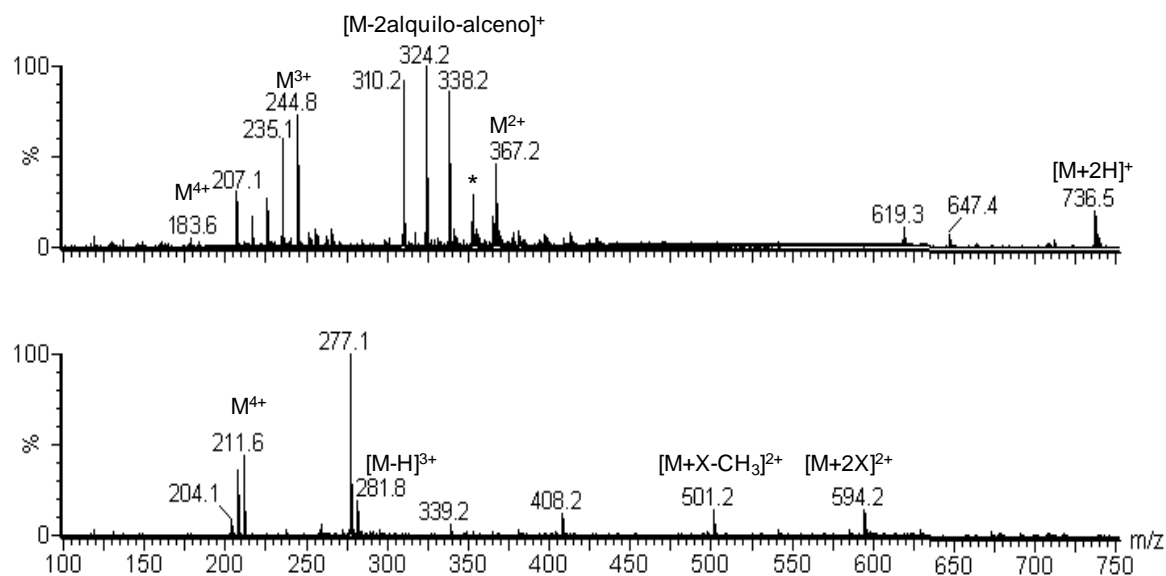


Figura 39 - Espectros de massa obtidos para A - porfirina **15** e B - porfirina **18**

* - m/z 352.7 correspondente ao ião $[M^{4+}+2e^{-}-\text{alquilo}]^{2+}$

Tabela 4 - Principais iões observados nos espectros de massa das várias porfirinas

	Porfirinas				
	14	15	16	17	18
Iões					
$[M]^{4+}$	169.6	183.6	225.7	323.8	211.6
$[M^{4+} - \text{alquilo}]^{4+}$	---	---	---	---	207.9
$[M^{4+} - 2 \text{alquilo}]^{4+}$	---	---	---	---	204.1
$[M^{4+} - \text{alquilo}^+ - 3\text{alceno}]^{3+}$	---	207.1	---	---	---
$[M^{4+} - \text{alquilo}^+ - 2\text{alceno}]^{3+}$	---	216.5	---	---	---
$[M^{4+} - \text{alquilo}^+ - \text{alceno}]^{3+}$	---	225.8	253.8	---	---
$[M^{4+} - \text{alquilo}^+]^{3+}$	221.1	235.1	277.2	375.3	277.1
$[M^{4+} - H^+]^{3+}$	225.8	244.5	300.6	431.4	281.8
$[M^{4+} + e^-]^{3+}$	226.1	244.8	300.9	431.7	---
$[M^{4+} - 2 \text{alquilo}^+ - 2\text{alceno}]^{2+}$	---	310.2	---	---	---
$[M^{4+} - 2 \text{alquilo}^+ - \text{alceno}]^{2+}$	---	324.2	345.2	---	---
$[M^{4+} - 2 \text{alquilo}^+]^{2+}$	---	338.2	380.3	478.4	408.2
$[M^{4+} + 2e^- - \text{alquilo}^+]^{2+}$	---	352.7	---	563.0	---
$[M^{4+} + 4e^- + 2H^+]^{2+}$	---	---	---	648.6	---
$[M^{4+} - 2H^+]^{2+}$	338.2	366.2	450.3	646.6	---
$[M^{4+} + e^- - H^+]^{2+}$	338.7	366.7	450.9	647.1	---
$[M^{4+} + 2e^-]^{2+}$	339.2	367.2	451.3	647.6	---
$[M^{4+} - 3 \text{alquilo}^+ - \text{alceno}]^+$	---	619.3	---	---	---
$[M^{4+} - 3 \text{alquilo}^+]^+$	---	647.4	689.5	---	---
$[M^{4+} + 5e^- + 2H^+]^+$	680.4	736.5	904.8	1297.2	---

2.2B.2 - Espectros de iões-produto (MS/MS)

2.2B.2.1 - N-alkilpiridilporfirinas (porfirinas 14 a 17)

Iões M^{4+} e $[M^{4+}-H^+]^{3+}$

A fragmentação característica dos iões M^{4+} é devida, principalmente, a processos de separação de carga (perdas de grupos alquilo carregados positivamente), acompanhados, ou não, de perdas de alcenos neutros. Os iões $[M^{4+}-\text{alquilo}^+]^{3+}$, resultantes da perda de um grupo alquilo monocarregado, são os iões-fragmento mais abundantes nos espectros dos iões M^{4+} . A segunda espécie mais abundante observada, resulta de perdas de dois grupos alquilo monocarregados, com formação dos iões duplamente carregados $[M^{4+}-2\text{alquilo}^+]^{2+}$. As espécies resultantes de perdas de 3 alquilos monocarregados, $[M^{4+}-3\text{alquilo}^+]^+$ estão também presentes, embora tenham uma abundância relativa muito menor. Os sinais correspondentes a perdas conjuntas de um grupo alceno e um, dois e três grupos alquilo monocarregados, com formação dos iões $[M^{4+}-\text{alceno}-\text{alquilo}^+]^{3+}$, $[M^{4+}-\text{alceno}-2\text{alquilo}^+]^{2+}$ e $[M^{4+}-\text{alceno}-3\text{alquilo}^+]^+$ foram também identificados.

Como os iões $[M^{4+}+e^-]^{3+}$ para estas porfirinas têm um forte contributo dos iões $[M^{4+}-H^+]^{3+}$, (figura 38), vamos apenas descrever a fragmentação característica dos iões $[M^{4+}-H^+]^{3+}$. Estes iões fragmentam-se por processos de separação de carga com perda de um grupo alquilo monocarregado com a formação dos iões duplamente carregados $[(M^{4+}-H^+)-\text{alquilo}^+]^{2+}$.

Os iões $[(M^{4+}-H^+)-\text{alceno}-\text{alquilo}^+]^{3+}$, $[(M^{4+}-H^+)-\text{alceno}-2\text{alquilo}^+]^{2+}$ e $[(M^{4+}-H^+)-\text{alceno}-3\text{alquilo}^+]^+$, são formados apenas para as porfirina 15, 16 e 17, sendo também observadas, para estas porfirinas, as espécies $[(M^{4+}-H^+)-2\text{alquilo}^+]^+$, resultantes de perdas de dois grupos alquilo monocarregados.

Os espectros de iões-produto dos homólogos deuterados dos iões M^{4+} e $[M^{4+}-H^+]^{3+}$ foram também obtidos usando metanol deuterado (CD_3OD) como

solvente. As espécies deuteradas produzem o mesmo tipo de fragmentos que as correspondentes espécies não deuteradas.

Espécies reduzidas duplamente carregadas: iões $[M^{4+}+2e^-]^{2+}$ e $[M^{4+}+4e^-+2H^+]^{2+}$

Para as *N*-alquilpiridílporfirinas, os iões-produto mais abundantes dos precursores $[M^{4+}+2e^-]^{2+}$ são formados pela perda de dois radicais alquilo, embora os sinais correspondentes a perdas de um e três radicais alquilo tenham sido também observados. Neste caso considerámos a fragmentação do ião $[M^{4+}+2e^-]^{2+}$, uma vez que a contribuição para este do ião $[M^{4+}+e^--H^+]^{2+}$, é muito inferior à contribuição do ião $[M^{4+}-H^+]^{3+}$ para o ião $[M^{4+}+e^-]^{3+}$, podendo a primeira ser considerada desprezável.

Para as porfirinas **15**, **16** e **17**, as perdas de dois radicais alquilo, acompanhados da perda de um e dois alcenos, levam à formação dos iões $[(M^{4+}+2e^-)-alceno-2alquilo]^{2+}$ e $[(M^{4+}+2e^-)-2alceno-2alquilo]^{2+}$.

O ião-precursor $[M^{4+}+4e^-+2H^+]^{2+}$, que foi observado apenas para a porfirina **14**, apresenta como iões-fragmento principais, as espécies $[(M^{4+}+4e^-+2H^+)-2alquilo]^{2+}$ e $[(M^{4+}+4e^-+2H^+)-alquilo]^{2+}$. O ião $[(M^{4+}+4e^-+2H^+)-alquilo^+-2alquilo]^{2+}$, resultante das perdas de um grupo alquilo monocarregado e dois radicais alquilo neutros é também observado.

Tal como no caso dos iões M^{4+} e $[M^{4+}-H^+]^{3+}$ os espectros de iões-produto dos homólogos deuterados das espécies reduzidas duplamente carregadas foram também obtidos. As espécies deuterados produzem o mesmo tipo de fragmentos que as correspondentes espécies homólogas não deuteradas.

Espécies reduzidas monocarregadas: iões $[M^{4+}+5e^-+2H^+]^+$

A fragmentação característica destes iões, observados para todas as *N*-alquilpiridilporfirinas, consiste em perdas de um a três radicais alquilo. Tal como nos casos anteriores, as espécies deuteradas homólogas apresentam o mesmo tipo de fragmentação.

Como exemplo apresentam-se, na figura 40 os espectros dos iões-produto dos precursores $[M^{4+}+5e^-+2H^+]^+$ e $[(M^{4+}-2H^++2D)+5e^-+2D^+]^+$ para a porfirina 14.

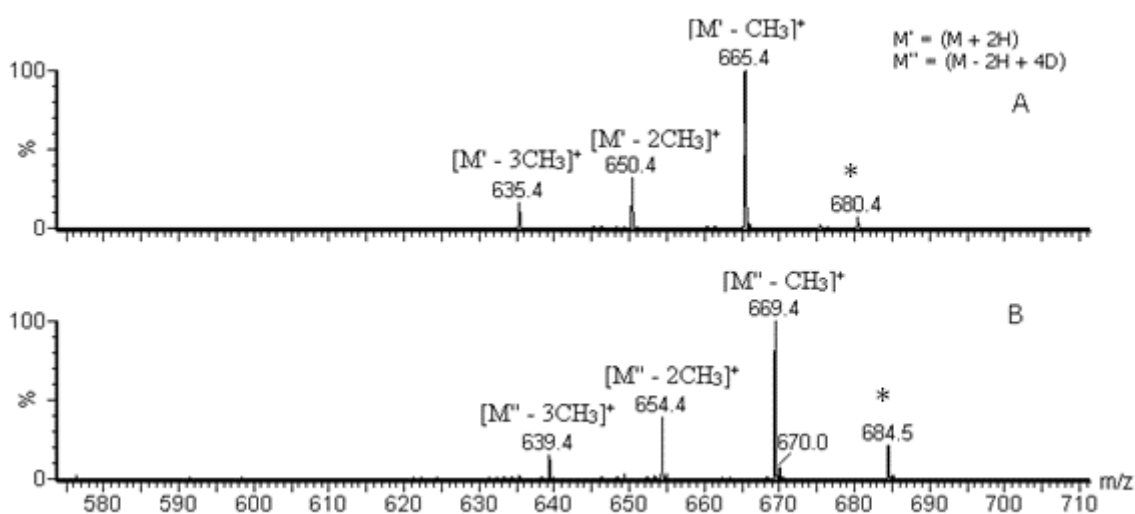


Figura 40 - Espectro de iões-produto obtido para a porfirina 14 em A - metanol e B - metanol deuterado; * - ião precursor

2.2B.2.2 - 5,10,15,20-tetraquis(4-trimetilamóniofenil)porfirina

Ao contrário do que foi observado para as outras porfirinas para os iões M^{4+} e $[M^{4+}-H^+]^{3+}$ da TTMAPP (porfirina 18) não se observa fragmentação por separação de carga. A fragmentação destes iões-precusores traduz-se na perda de grupos alquilo neutros dando origem a iões com fórmula geral $[M^{4+}-n \text{ alquilo}]^{4+}$ e $[(M^{4+}-H^+)-n \text{ alquilo}]^{3+}$ ($n=1-4$).

O principal ião-fragmento presente no espectro do aducto $[M^{4+}+2X]^{2+}$ é o ião $[M^{4+}-2CH_3]^+$. São também observados, embora com menor abundância, os

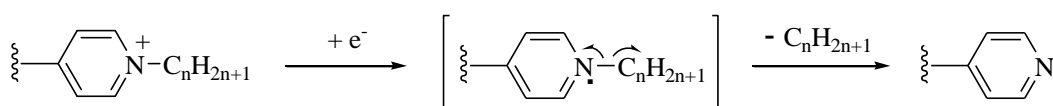
iões $[M^{4+}-CH_3^+]^{3+}$ e $[M^{4+}+X^--CH_3^+]^{2+}$. O fragmento mais abundante formado a partir do aducto $[M^{4+}+X^--CH_3^+]^{2+}$ é o ião $[M^{4+}-2CH_3^+]^{2+}$.

Verificámos que, para todas as *N*-alquilpiridilporfirinas, porfirinas **14** a **17**, ocorria a formação de iões resultantes de processos de redução envolvendo vários electrões, havendo também espécies iónicas formadas por protonação e redução. Para a trimetilamoniofenilporfirina, porfirina **18**, observa-se a formação de aductos com os contra-iões, não se observando esta formação para nenhuma das outras porfirinas.

A formação de espécies reduzidas no caso das *N*-alquilpiridilporfirinas parece ser independente do tipo e estrutura atómico-molecular do contra-ião presente, o que foi confirmado pela formação de espécies reduzidas para os diferentes sais da porfirina **14** estudados (contra-iões I^- e $CH_3C_6H_4SO_3^-$).

Os resultados obtidos com este segundo grupo de porfirinas confirmam o mecanismo atrás proposto envolvendo a formação de aductos porfirina/contra-ião/solvente. Se assumirmos que os aductos são formados após o processo de solvatação, de forma semelhante à descrita para alguns analitos dicatiónicos⁶⁴, uma transferência de electrões do contra-ião levaria à formação de espécies hipervalentes.

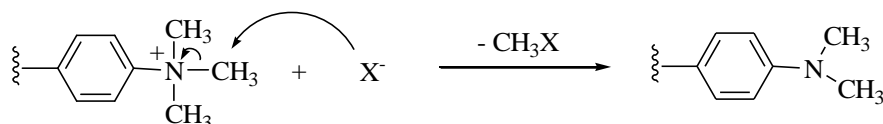
Os radicais hipervalentes aromáticos como $[M^{4+}+e^-]^{3+}$ e $[M^{4+}+2e^-]^{2+}$, formados por redução por um e dois electrões a partir das *N*-alquilpiridilporfirinas são suficientemente estáveis para serem observados. A fragmentação destas espécies por perda de radicais alquilo dando origem a piridinas neutras confirma o seu carácter hipervalente (esquema 5).



Esquema 5

O comportamento da trimetilamoniofenilporfirina, porfirina **18**, confirma igualmente o mecanismo proposto. Os radicais hipervalentes formados neste caso são espécies transientes, não se detectando no espectro de massa. Em contrapartida observam-se aductos com o contra-ião e fragmentos formados por

perdas de alquilo e de contra-íão a partir desses aductos. Um possível mecanismo para as fragmentações $[M^{4+}+X]^{3+} \rightarrow [M^{4+}-CH_3^+]^{3+}$ e $[M^{4+}+2X]^{2+} \rightarrow [M^{4+}-2CH_3^+]^{2+}$ poderá ser um ataque nucleófilo ao grupo trimetilamônio, por parte do contra-íão, seguido da eliminação de CH_3X (esquema 6).



Esquema 6

A formação dos iões $[M^{4+}-alquilo^+]^{3+}$ e $[M^{4+}-2alquilo^+]^{2+}$, no caso das *N*-alquilpiridilporfirinas, pela via proposta no esquema 6, também é possível. No entanto, como os radicais hipervalentes formados no caso destes compostos são estáveis, o mecanismo apresentado no esquema 5 é uma alternativa muito mais provável.

No caso geral, os fragmentos formados por perdas grupos alquilo podem ocorrer por três vias diferentes:

- perda de um radical neutro, quer a partir do catião M^{4+} (porfirina **18**), quer a partir de uma espécie hipervalente reduzida, (para as *N*-alquilpiridilporfirinas) com formação de piridinas (esquema 5)
- perda de uma espécie carregada, (para as *N*-alquilpiridilporfirinas), através de um processo de separação de carga
- eliminação de uma espécie neutra alquilo/contra-íão (no caso da porfirina **18**) por ataque nucleófilo do contra-íão ao substituinte carregado positivamente (esquema 6).

Para as *N*-alquilpiridilporfirinas com substituintes alquilo com cadeias mais longas, observam-se perdas conjuntas de alceno e radicais alquilo, no entanto não se observam perdas de alceno isoladas. As perdas de alceno (associadas às perdas de alquilo) devem envolver uma passagem de um radical hidrogénio de uma posição β dos grupos alquilo, para um dos carbonos adjacentes do grupo piridínio.

Como se disse atrás, os aductos com os contra-íões foram apenas observados para a porfirina **18**, no entanto, a formação de aductos de *N*-

metilpiridilporfirinas metaladas (Mn (III)) com o contra-íão Cl^- , já tinha sido observada, por Batinic-Haberle *et al.*^{41,43} mas não para porfirinas na forma de bases livres, tendo estes autores sugerido que os aductos resultariam de uma ligação axial do cloreto ao centro metálico.^{41,43} Por outro lado Bigey *et al.* observaram a formação de aductos com o contra-íão $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3^-$ para N-metilpiridilporfirinas na forma de bases livres.⁴⁰

Os estudos referidos anteriormente^{40,41,43} foram realizados usando como solvente misturas acetonitrilo/água (1:1). No presente caso, o solvente usado foi o metanol e com este solvente os processos de redução das N-alquilpiridilporfirinas predominam, o que pode explicar a não observação de aductos com o contra-íão. Aductos com o contra-íão no caso de pesticidas com grupos metilpiridínio, em soluções de água-metanol (1:1), foram observados por Milman, mas neste caso a concentração das soluções era muito mais elevada, uma vez que um dos objectivos era a maximização da formação de aductos.³⁷

2.3 - Conclusões

Em face dos resultados obtidos com o segundo conjunto de porfirinas, sugere-se que os processos de redução ocorram nas gotículas, em zonas da fonte com pressão relativamente elevada⁷¹. Os aductos com os contra-íões existentes nas gotículas podem ser de dois tipos diferentes: agregados iónicos solvatados fortes (tight ion pair clusters) $[M^{p+} + m \text{ (contra-íão)} + n \text{ (CH}_3\text{OH)}]^{(p-m)+}$, e agregados iónicos solvatados fracos (loose ion pair clusters)³⁷ $[M^{p+} + n \text{ (CH}_3\text{OH)} + m \text{ (contra-íão)}]^{(p-m)+}$. A formação de espécies como $[M^{4+} + e^-]^{3+}$ e $[M^{4+} + 2e^-]^{2+}$ ocorre provavelmente a partir dos primeiros por transferência directa de electrões dos contra-íões para os macrociclos porfirínicos. Por outro lado, a formação das espécies reduzidas protonadas $[M^{4+} + 4e^- + 2H^+]^{2+}$ e $[M^{4+} + 5e^- + 2H^+]^+$, ocorrerá a partir dos segundos, nos quais as porfirinas e os contra-íões estão separados por moléculas de solvente. A formação das espécies reduzidas pode ocorrer, quer a partir dos primeiros por transferência directa de electrões dos contra-íões para os macrociclos porfirínicos, quer a partir dos segundos, nos quais as porfirinas e os contra-íões estão separados por moléculas de solvente.

Para as *N*-alquilpiridilporfirinas, a abundância relativa dos iões $[M^{4+} + 5e^- + 2H^+]^+$ diminui com o aumento do comprimento da cadeia alquílica. Este facto pode ser explicado por um enriquecimento, na superfície da gota, dos catiões das porfirinas com cadeias mais compridas, devido à sua maior liofobicidade. Uma maior evaporação/transferência dos iões M^{4+} para a fase gasosa diminui a probabilidade da ocorrência da redução no interior das gotículas conduzindo a uma formação, menos abundante, das espécies reduzidas.

As espécies reduzidas observadas são radicais hipervalentes formados a partir dos catiões por redução por vários electrões ou por protonação e redução por vários electrões.

Apesar de pouco provável e contra-intuitiva a redução de porfirinas catiónicas, na forma de bases livres ocorre durante o processo de Electrospray e foi pela primeira vez observada no decorrer do presente trabalho.

2.4 - Parte Experimental

As porfirinas e a clorina catiónicas foram obtidas a partir das correspondentes espécies neutras por alquilação, com iodeto de metilo, em dimetilformamida seca. As espécies neutras foram formadas por reacções cruzadas de Rothmund usando benzaldeídos adequados e pirrol, em refluxo de ácido acético e nitrobenzeno.⁷²⁻⁷⁴ Os *p*-toluenossulfonatos da 5,10,15,20-tetraquis(*N*-metilpiridínio-4-il)porfirina, TMPyP, e da 5,10,15,20-tetraquis(4-trimetilamóniofenil)porfirina, TTMAPP, foram adquiridos a Sigma-Aldrich (Espanha).

Os compostos obtidos foram caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN) ¹H, ¹⁹F, e ¹³C, análise elementar e por espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Vis).

Para as experiências de espectroscopia de UV-vis) foram usadas soluções aproximadamente 10⁻⁵ mol.dm⁻³ das porfirinas dissolvidas em metanol.

Para a primeira parte do estudo (primeiro grupo de porfirinas, **9 a 13**) foram preparadas soluções das diferentes porfirinas com concentrações de cerca de 0.86, 1.70, e 3.47 µmol dm⁻³, tendo sido testados diversos solventes (metanol, 1% vol/vol de *N,N*-dimetilanilina em metanol, acetonitrilo e metanol deuterado). Os fluxos de introdução da amostra usados foram 5, 7.5 e 10 µL min⁻¹.

Para a segunda parte do estudo (segundo grupo de porfirinas, **14 a 18**) foram preparadas soluções das porfirinas aproximadamente 10⁻⁵ mol dm⁻³ em metanol e metanol deuterado que foram introduzidas a um fluxo de 10 min µl⁻¹.

As amostras foram analisadas após serem dissolvidos nos solventes indicados, e submetidas a ultrasons durante alguns minutos.

O espectrómetro de massa foi calibrado diariamente utilizando soluções aquosas de leucina-encefalina e prolina diluídas em metanol. Os sinais escolhidos para calibração foram os seguintes: *m/z* 116.0712, 138.0531, 556.2771, 578.2491, 1111.5464 e 1133.5284 Th. A calibração foi feita no intervalo de valores de *m/z* compreendido entre 100 a 1500. Um mínimo de 30 varrimentos foi registado para cada espectro, tendo sido escolhido um polinómio de ordem 4,

como curva de ajuste. O sinal com m/z 578.2491 foi usado para definir a resolução nominal de 9000 usada nas diferentes experiências.

Os espectros de iões-produto (ESI-MS/MS) foram adquiridos, com energias que variaram entre 20-75 eV, seleccionando os iões de interesse com o quadrupolo e usando o hexapolo como célula de colisões.

Bibliografia

¹ Reuben A. *Hepatology*. **2006**; 43: 1403

² Thudichum JLW. *Tenth Report Med. Off. Privy Council*. **1867**, Apêndice 7-10, pág. 152, citado em “Pomarico G. *Dissertação de Doutorado*. Università di Tor Vergata. Roma. **2009**”

³ Hoppe-Seyler F. *Med. Chem. Unters*. **1871**; 4: 531

⁴ Pomarico G. *Dissertação de Doutorado*. Università di Tor Vergata. Roma. **2009**

⁵ Nencki M, Sieber N. *Arch. Exptl. Path. Pharmacol*. **1884**; 18: 401

⁶ Manso C, Freire A, Azevedo M. “Introdução à Bioquímica Humana”, Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. **1986**; 3: 147

⁷ Cavaleiro JAS, Smith KM. *Rev. Port. Quím*. **1989**; 31: 29

⁸ <http://en.wikipedia.org/wiki/Heme> (em 23-01-2012)

⁹ <http://www.chemistry.wustl.edu/~edudev/LabTutorials/Hemoglobin> (em 23-01-2012)

¹⁰

<http://ies.rayuela.mostoles.educa.madrid.org/deptos/dbiogeo/recursos/Apuntes/ApuntesBioBach2/3-MorfoCelular/Cloroplasto.htm> (em 24-01-2012)

¹¹ Küster WZ. *Physiol. Chem*. **1912**; 82: 463

¹² Fischer H, Klarer JJ. *Liebigs Ann. Chem*. **1926**; 450: 181

- ¹³ Clark JC. *Dissertação de Doutorado*. University of Mississippi. **2005**
- ¹⁴ Fischer H, Wallach BJ. *Liebigs Ann. Chem.* **1926**; 468: 98
- ¹⁵ Milgrom LR. *The colours of life*. Oxford University Press. Oxford. **1997**. Pág. 4
- ¹⁶ Smith GJ, Ghiggino KP, Bennett LE, Nero T. *Photochem Photobiol.* **1989**; 49(1): 49
- ¹⁷ Smith KM. *Porphyrins and Metalloporphyrins*. Elsevier Scientific Publishing Company. Amesterdão. **1975**
- ¹⁸ Lindsey JS. *The porphyrin handbook*. Kadish KM, Smith KM, Guillard R. (Ed.) Academic Press. Nova Iorque. **2000**; vol. 3: cap. 2
- ¹⁹ Gonsalves AMd'AR, Varejão JMTB, Pereira MM. *J. Heterocyclic Chem.* **1991**; 28: 635
- ²⁰ Tabata M, Nishimoto J. *The porphyrin handbook*. Kadish KM, Smith KM, Guillard R. (Ed.) Academic Press. Nova Iorque. **2000**; 9 (60)
- ²¹ Ortega YR, Toledano CA, Rosales DR, Sandoval AS, Ulloa RZ. *J. Chem.Soc.* **1998**; 4: 667
- ²² Murakami Y, Kikuchi J, Hisaeda Y, Hayashida O. *Chem. Rev.* **1996**; 96: 721
- ²³ Solladié N, Hamel A, Gross M. *Tetrahedron Letters.* **2000**; 41: 6075
- ²⁴ Chambron J-C, Heitz V, Sauvage J-P. *The porphyrin handbook*. Kadish KM, Smith KM, Guillard R. (Ed.) Academic Press. Nova Iorque. **2000**; vol. 6

- ²⁵ Carré V, Gaud O, Sylvian I, Bourdon O, Spiro M, Blais J, Granet R, Krausz M, Guilloton M. J. **1999**; 48: 57, citado em “Tomé JPC. *Dissertação de Doutoramento*. Aveiro. **2001**”
- ²⁶ Ben Amor T, Tronchin M, Bortolotto L, Verdiglione R, Jori G. *Photochem. Photobiol.* **1998**; 67(2): 206
- ²⁷ MacDonald IJ, Dougherty TJ. *J. Porphyrins and Phtalocyanines*. **2001**; 5: 105
- ²⁸ Bonnett R. *Chemical aspects of Photodynamic Therapy*. Gordon and Breach Science Publishers. Advanced Chemistry Texts. **2000**. Vol. 1
- ²⁹ Blades AT, Ikonomou MG, Kebarl P. *Anal. Chem.* **1991**; 63: 2109
- ³⁰ Van Berkel, G. J. The Electrolytic Nature of Electrospray. In *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications*, Cole, R. B., Ed.; John Wiley & Sons: New York. **1997**. Pág. 65
- ³¹ De la Mora JF, Van Berkel GJ, Enke CG, Cole RB, Martinez-Sanchez M, Fenn JB. *J. Mass Spectrom.* **2000**; 35: 939
- ³² Van Berkel GJ, McLuckey SA, Glish GL. *Anal. Chem.* **1991**; 63: 1098
- ³³ Van Berkel GJ, Zhou F. *Anal. Chem.* **1995**; 67: 2916
- ³⁴ Van Berkel GJ, Zhou F. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1996**; 7: 157
- ³⁵ Van Berkel GJ, Quirke JME, Tigani RA, Dilley AS, Covey TR. *Anal. Chem.* **1998**; 70: 1544
- ³⁶ Van Berkel GJ. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**; 11: 951

- ³⁷ Milman BL. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**; 17: 1344
- ³⁸ Song X, Budde W. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1996**; 7: 981
- ³⁹ Moyano E, Games DE, Galceran MT. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**; 10: 1379
- ⁴⁰ Bigey P, Frau S, Loup C, Claparols C, Bernadou J, Meunier B. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1996**; 133: 679
- ⁴¹ Batinic-Haberle I, Stevens RD, Fridovich I. *J. Porphyrins Phthalocyanins* **2000**; 4: 217
- ⁴² Kachadourian R, Srinivasan N, Haney CA, Stevens RD. *J. Porphyrins Phthalocyanins* **2001**; 5: 507
- ⁴³ Batinic-Haberle I, Spasojevic I, Stevens RD, Hambright P, Fridovich I. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2002**; 2689
- ⁴⁴ Ramos CIV, Barros CM, Santana-Marques MG, Ferrer Correia AJ, Tomé JC, Tomé AC, Neves MGPMS, Cavaleiro JAS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**; 18: 762
- ⁴⁵ Cerny RL, Gross ML. *Anal. Chem.* **1985**; 57: 1160
- ⁴⁶ Musselman BD, Watson JT. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1987**; 14: 247
- ⁴⁷ Vekey K. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1990**; 97: 265
- ⁴⁸ Ohashi Y, Itoh I. *Curr. Org. Chem.* **2003**; 7: 1605

- ⁴⁹ Kurlansk L, Williams TJ, Strong JM, Anderson LW, Campana JE. *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**; 11: 475
- ⁵⁰ Tarnaud E, Robic N, Gaudemer A, Bied-Charreton C, Deprun C. *Org. Mass Spectrom.* **1993**; 28: 132
- ⁵¹ Liu S-Q, Sun H-R, Sun M-Z, Xu J-Q. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**; 13: 2034
- ⁵² Tomazela DM, Gozzo FC, Mayer I, Engelmann FM, Araki K, Toma HE, Eberlin MN. *J. Mass Spectrom.* **2004**; 39: 1161
- ⁵³ Ryan TM, Day RJ, Cooks RG. *Anal. Chem.* **1980**; 52: 2054
- ⁵⁴ Vincze A, Busch KL, Cooks RG. *Anal. Chim. Acta* **1982**; 136: 143
- ⁵⁵ Heller DN, Yergey J, Cotter RJ. *Anal. Chem.* **1983**; 55: 1310
- ⁵⁶ Clayton E, Wakefield AJC. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**; 969
- ⁵⁷ Claereboudt J, Baeten W, Geise H, Claeys M. *Org. Mass Spectrom.* **1993**; 28: 71
- ⁵⁸ Kunkel GJ, Busch KL, Dunphy R, Burinsky DJ, Barak R, Bel P, Amitai G, Vincze A. *J. Mass Spectrom.* **1995**; 30: 282
- ⁵⁹ Marr JC, King JB. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**; 11: 479
- ⁶⁰ Lazar AC, Reilly PTA, Whitten WB, Ramsey JM. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**; 14: 1523

- ⁶¹ Shaffer AS, Turecek F. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1995**; 6: 1004
- ⁶² Smith KM. *Porphyrins and Metalloporphyrins*, Elsevier Scientific: Amsterdam, Netherlands. **1975**. Pág. 19-27
- ⁶³ Hashimoto T, Choe Y-K, Nakano H, Hirao K. *J. Phys. Chem.* **1999**; 103: 1894
- ⁶⁴ Wang G, Cole RB. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1996**; 7: 1050
- ⁶⁵ Christie CG. *Anal. Chem.* **1997**; 69: 4885
- ⁶⁶ Shvartsburg AA. *Chem. Phys. Lett.* **2002**; 360: 479
- ⁶⁷ Van Berkel GJ, Zhou F, Aronson JT. *Int. J. Mass Spectrom. Ion. Proc.* **1997**; 162: 55
- ⁶⁸ Neri BP, Wilson GS. *Anal. Chem.* **1972**; 44: 1002
- ⁶⁹ Gatlin CL, Turecek F. *Anal. Chem.* **1994**; 66: 712
- ⁷⁰ Zhou S, Prebyl BS, Cook KD. *Anal. Chem.* **2002**; 74: 4885
- ⁷¹ Enke CG. *Anal. Chem.* **1997**; 69: 4885
- ⁷² Lindsey JS. Synthesis of *meso*-Substituted Porphyrins. In *The Porphyrin Handbook—Synthesis and Organic Chemistry*, vol. 1, Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R., Eds.; Academic Press: London. UK. **2000**. Pág. 45
- ⁷³ Tomé JPC, Neves MGPMS, Tomé AC, Cavaleiro JAS, Soncin M, Magaraggia M, Ferro S, Jori G. *J. Med. Chem.* **2004**; 47: 6649

⁷⁴ Tomé JPC, Mendonça AF, Neves MGPMS, Tomé AC, Valdeira ML, Cavaleiro JAS. PT Patent **2001**; 102: 572

CAPÍTULO 3.

*ISÓMEROS DE AMINOMETILCORRÓIS:
CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO
POR ESPECTROMETRIA DE MASSA*

3.1 - Introdução

3.1.1 - Considerações gerais

O início da história de outros macrociclos tetrapirrólicos, os corróis, pode-se considerar ter ocorrido em 1920, quando G. Whipple¹ verificou que uma dieta rica em fígado aumentava a capacidade regenerativa da hemoglobina.

Mais tarde, em 1926, G. Minot e W. Murphy² verificaram que a dieta postulada Whipple, que ficou conhecida como Terapia do Fígado, restabelecia o nível dos glóbulos vermelhos em doentes com anemia perniciosa, podendo ser usada como forma de tratamento daquela doença.

K. Folkers *et al.*³, no final dos anos 40, ao tentar determinar qual o princípio activo responsável pela regeneração da hemoglobina isolaram, a partir do fígado, um pigmento vermelho cristalino, designando-o por vitamina B12. Em 1949, J. Pierce *et al.*⁴ isolaram duas formas cristalinas da vitamina B12 - a cianocobalamina e a hidroxicobalamina - igualmente eficazes no tratamento de pacientes anémicos.

D. Crowfoot-Hodgkins, em 1956, usando difracção por Raios X, esclareceu completamente a estrutura da cianocobalamina⁵ (figura 41). O novo tipo de macrociclo presente na cianocobalamina passou a ser designado por corrina.

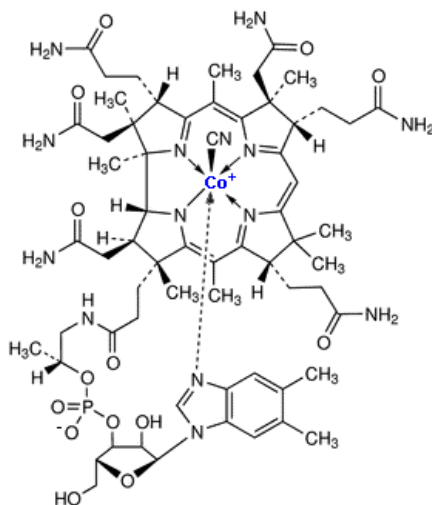


Figura 41 - Estrutura da cianocobalamina⁶

Na procura de possíveis métodos de síntese para a preparação de corrinas, A. Johnson e R. Price⁷, em 1960, isolaram um macrociclo semelhante à corrina, mas com onze ligações duplas em vez de seis (composto I, figura 42 A). Alguns anos mais tarde, A. Johnson e I. Kay⁸ corrigiram a estrutura inicialmente proposta, e sugeriram para a nova estrutura, com menos uma ligação dupla, o termo corrol.

A estrutura de um corrol, o 8,12-dietil-2,3,7,13,17,18-hexametilcorrol,⁹ foi pela primeira vez elucidada, em 1971, por cristalografia de Raios X, tendo-se confirmado que o macrociclo central correspondia à estrutura B da figura 42, constituída por quatro unidades pirrólicas unidas por uma ligação directa carbono-carbono e três pontes metínicas.

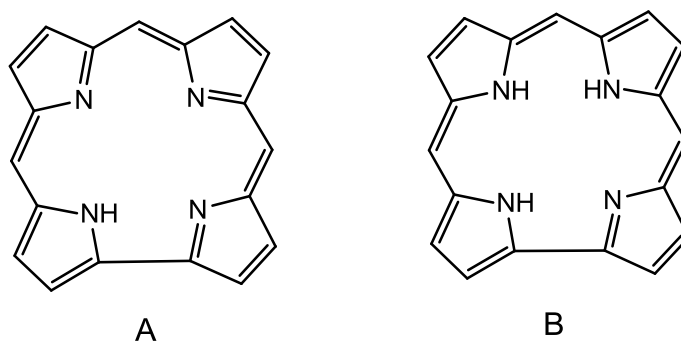


Figura 42 - Estruturas de: A - composto I; B - estrutura final para o macrociclo central dos corróis

Durante um longo período a química dos corróis não se desenvolveu muito. Esta situação mudou, em 1999, quando foram propostos métodos diferentes para a síntese de macrociclos deste tipo, nomeadamente de *meso*-trialrilcorróis. Assim, após a implementação de novas metodologias sintéticas que permitiram melhorar os rendimentos dos processos de síntese de corróis, têm sido feitos estudos mais desenvolvidos e numerosos sobre a reactividade deste macrociclo.

Como se disse atrás, o macrociclo tetrapirrólico dos corróis é constituído por três pirróis unidos por pontes metínicas contendo para além destas, uma ligação directa entre duas unidades pirrólicas. Esta última torna o macrociclo corrólico menos simétrico que o macrociclo porfirínico, no entanto, tal como

acontece no caso das porfirinas, o seu carácter aromático é assegurado pela deslocalização de 18 electrões π .

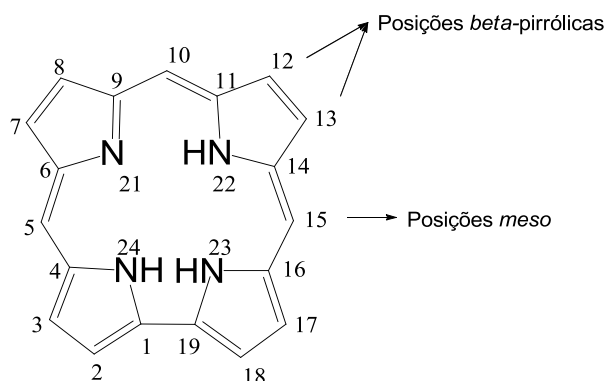


Figura 43 - Nomenclatura IUPAC para os corróis

Tal como se pode verificar na figura **43**, embora na numeração dos macrociclos corrólicos a posição 20 seja inexistente, os átomos de azoto internos mantêm-se a sua numeração de 21 a 24 e, desta forma, a nomenclatura destes macrociclos é idêntica à estabelecida para as porfirinas¹⁰, sendo também usada a terminologia posições *meso* e posições β -pirrólicas.

3.1.2 - Propriedades físicas e químicas

Tal como as porfirinas, os corróis são compostos corados sendo o seu espectro de UV-vis (semelhante ao das porfirinas) dominado pela “banda Soret” entre 390 e 425 nm, observando-se igualmente outras quatro “bandas Q” entre os 500-700 nm. A “banda Soret” é característica da deslocalização dos dezoito electrões π conjugados do macrociclo, o que significa que, tal como no caso das porfirinas, esta banda só desaparece em casos em que o anel sofre abertura ou a conjugação é interrompida por qualquer outro motivo. Como também se verifica para as porfirinas, a formação de ligações π - π com outros sistemas aromáticos pode provocar desvios do máximo de absorção para comprimentos de onda mais elevados.

São duas as principais diferenças dos espectros de absorção dos corróis, nomeadamente dos *meso*-triarilcorróis, em relação aos das porfirinas. Os espectros de absorção dos corróis exibem uma maior variação nas bandas de absorção quando ocorre a substituição dos grupos fenilo e a posição das bandas de absorção é muito dependente do tipo de solvente usado (solvatocromismo).^{11,12}

A modulação das propriedades físico-químicas dos corróis pode ser alcançada através da funcionalização das suas posições *meso* ou β -pirrólicas. A funcionalização destas últimas é geralmente feita a partir de metalocorróis, de forma a proteger a cavidade do corrol e evitar a fragmentação do macrociclo¹³. O corrol mais estudado, o 5,10,15-*tris*(pentafluorofenil)corrol e o seu complexo de gálio(III) (o protótipo perfeito para os metalocorróis, tal como o (*meso*-tetrafenilporfirinato)zinco(II), [Zn(TPP)], é o protótipo perfeito para as metaloporfirinas), são muito usados como materiais de partida, na síntese de novos corróis.¹⁴⁻¹⁷

3.1.3 - Preparação, reactividade e aplicações

Os primeiros métodos de síntese de macrociclos corrólicos surgiram durante a década de noventa,^{18,19} no entanto, estes processos apresentavam sempre, produtos da reacção secundários, tais como corróis substituídos nas posições β ou nas posições β e *meso*.

Outros métodos de síntese foram entretanto propostos²⁰⁻²² e, em 2003, D. Gryko e B. Koszarna²³ desenvolveram um novo procedimento para a síntese de *meso*-triarilcorróis, baseado no trabalho de C. Lee.²² O procedimento geral desta síntese consiste na adição de ácido trifluoroacético (TFA) a uma mistura de aldeído e pirrol.

Mais recentemente, em 2008, foi proposto um outro procedimento de síntese, considerado mais eficiente usando, como produtos de partida, aldeídos aromáticos e pirrol²⁴. Este procedimento é realizado na ausência de solventes uma vez que, na presença destes a formação da porfirina, como produto

secundário é favorecida, o que torna o processo de purificação do corrol bastante mais moroso e complicado.

Tal como as porfirinas, os corróis são substâncias anfotéricas, isto é, na sua forma livre, podem comportar-se como ácidos ou como bases, aceitando ou perdendo prótons e formando espécies mono e di-catiónicas e mono e di-aniónicas, respectivamente. Todas as formas aniónicas e catiónicas são aromáticas e apresentam, nos seus espectros de absorção, bandas Q mais intensas, quando comparadas com as respectivas formas neutras.

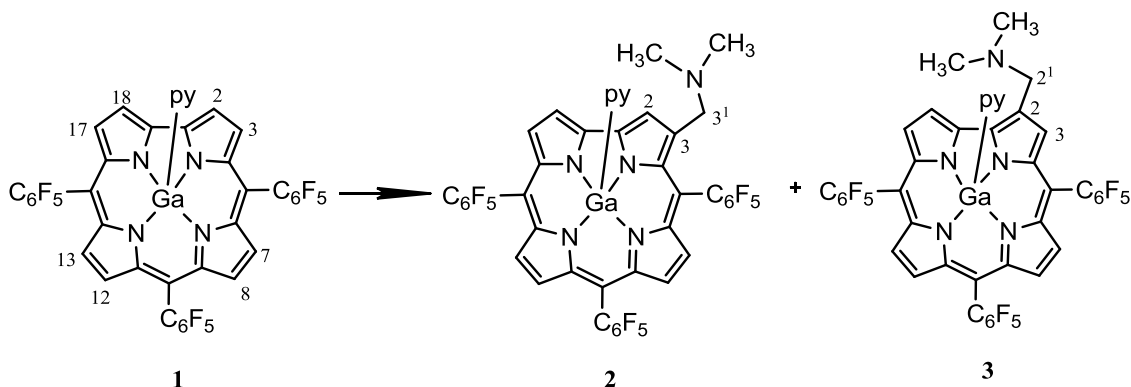
A cavidade interna dos corróis é menor que a da porfirimina, o que lhe confere a capacidade de estabilizar iões metálicos com menor raio iónico e com estados de oxidação mais elevados, tais como Cr(V), Fe(III), Fe(IV), Co(IV), Co(V) e Mn(III). Os corróis são ligandos trianiónicos e formam complexos neutros com iões metálicos no estado de oxidação três.

Os corróis podem participar em reacções de ciclo-adição, tendo sido demonstrado que estes macrociclos podem participar, como dienos ou dienófilos²⁵, em reacções de Diels-Alder e em reacções de ciclo-adição [4+4]. O comportamento dos corróis como dipolos do tipo 1,3 também foi estudado em reacções de ciclo-adição com vários dipolarófilos.²⁶⁻²⁸

Nos últimos anos, a descoberta de sínteses fáceis e eficientes de *meso*-triarylcorróis, a partir de precursores comercialmente disponíveis,^{20,29-31} foi responsável pelo grande desenvolvimento da química destes compostos, que podem ser usados num grande número de aplicações.^{32,33} O interesse suscitado por estes compostos deve-se ao seu comportamento fotofísico,¹¹ à sua reactividade química³⁴ e à sua capacidade de estabilizar iões metálicos em estados de oxidação elevados³⁵. Estas propriedades importantes justificam várias aplicações práticas dos corróis, como por exemplo sensores,³⁶⁻³⁸ sistemas de transferência electrónica,³⁹ catalisadores de vários tipos de reacções^{40,41} e fármacos.^{42,43}

3.2 - Caracterização por espectrometria de massa de isómeros de aminometilcorróis com comportamento invulgar em fase gasosa

Durante a investigação da reacção do tris(pentafluorofenil)corrolato gálio(III) (composto **1**) com paraformaldeído e sarcosina, desenvolvida no Laboratório de Química Orgânica da Universidade de Aveiro, foram isolados dois novos derivados aminometilo daquele composto, corróis **2** e **3** (esquema 7),⁴⁴ em vez dos cicloaductos esperados, obtidos em condições semelhantes para porfirinas.⁴⁵ Estes compostos, com uma molécula de piridina (py) em posição axial, foram caracterizados por várias técnicas espectroscópicas, incluindo a espectrometria de massa.



Esquema 7

A ESI-MS tem sido utilizada em conjunto com outras técnicas espectroscópicas para identificar e caracterizar novos corróis,^{13,23,28,40,46-52} nomeadamente através da determinação das massas exactas dos compostos sintetizados. No entanto, são escassos os estudos de corróis usando exclusivamente esta técnica,⁵³⁻⁵⁵ não obstante ter sido inequivocamente estabelecida a utilidade da ESI-MS na obtenção de informações relevantes para a síntese global de novas estruturas porfirinóides⁵³.

A diferenciação de isómeros posicionais por espectrometria de massa, em geral, e por ESI-MS, em particular, não é habitualmente fácil, nem efectiva. Em alguns casos pode ser conseguida pela obtenção de espectros de iões-produto de aductos, complexos ou espécies derivatizadas, quer *in situ*, quer antes da

introdução da amostra no espectrómetro de massa. No caso específico de moléculas protonadas de isómeros posicionais, a sua diferenciação envolve geralmente o recurso a espectrometria de massa por etapas (ou de multi-estágios) MS^n ($n \geq 2$).

No caso presente, durante os nossos estudos prévios usando ESI-MS observámos a formação de vários tipos de iões que podem ser utilizados, com sucesso, na diferenciação de isómeros deste tipo, nomeadamente espécies formadas pela adição invulgar de moléculas de água a iões-fragmento.

A detecção destas espécies, atípicas e potencialmente úteis, levou-nos a investigar com maior profundidade a química em fase gasosa destes isómeros usando ESI-MS, nos modos de iões positivos e negativos, e recorrendo a vários procedimentos, nomeadamente, determinações de massas exactas, espectrometria de massa por etapas ESI- MS^n ($n = 2$ e 3) e espectrometria de massa com resolução de energia (curvas de decaimento). Para elucidar os mecanismos de fragmentação em fase gasosa, incluindo as estruturas das várias espécies iónicas destes novos compostos foram também realizados cálculos semi-empíricos.

3.2.1 - Estudos no modo de iões positivos

3.2.1.1 - Espectros de massa

Os espectros de massa dos corróis **2** e **3** foram obtidos com dois espectrómetros de massa diferentes, um Q-ToF e uma trapa de iões. Em todos os espectros de massa obtidos foram identificados sinais com razão massa/carga, m/z 920, $[(M-py)+H]^+$, formado por protonação do átomo de azoto da dimetilamina e perda da piridina axial. Sinais correspondentes a iões com m/z 875, formados por eliminação de dimetilamina, $[(M-py)+H-(CH_3)_2NH]^+$ foram também observados sendo estes os iões mais abundantes.

Os espectros de massa obtidos, nas mesmas condições experimentais, no instrumento Q-ToF, para ambos os isómeros, corróis **2** e **3**, são apresentados na figura 44.

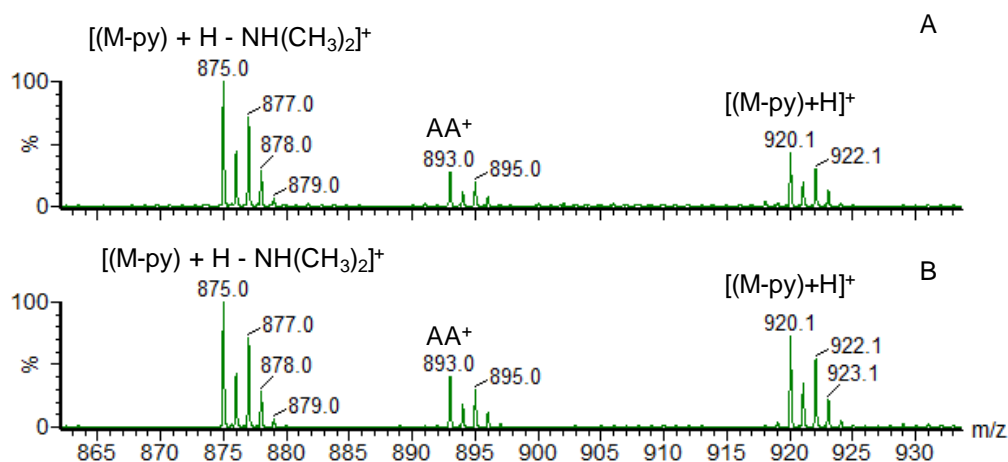


Figura 44 - Espectro de massa de A - corrol **2**, B - corrol **3**; AA^+ - $[(M-py)+H-(CH_3)_2NH+H_2O]^+$.

Como se pode ver, para além dos iões com m/z 920 e 875 referidos, observam-se também iões com m/z 893 (AA^+).

Os espectros de massa obtidos nas experiências efectuadas na trapa de iões são semelhantes aos obtidos no espectrómetro de massa Q-ToF, no entanto, os sinais com m/z 893 não foram observados, o que se pode verificar na figura 45

onde se podem comparar os sinais obtidos, nos dois espectrómetros, para o corrol **3**.

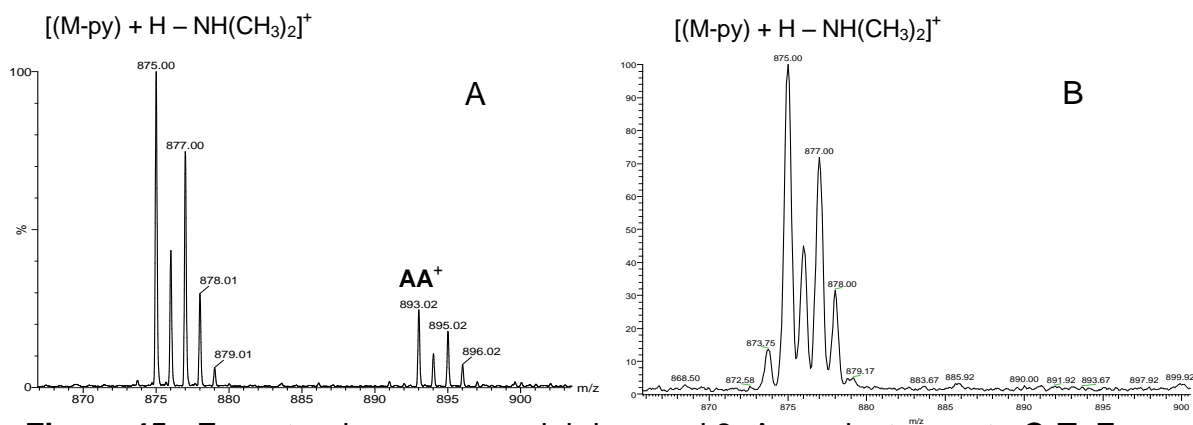


Figura 45 - Espectro de massa parcial do corrol **3**: A - no instrumento Q-ToF, B - na trapa de iões; AA^+ - $[(M-py)+H-(CH_3)_2NH+H_2O]^+$

Estas espécies, com m/z 893, podem corresponder à adição de uma molécula de água aos iões-fragmento com m/z 875, ou seja podem ter a fórmula $[(M-py)+H-(CH_3)_2NH+H_2O]^+$ e a composição elementar $C_{38}H_{11}N_4OF_{15}Ga$. No entanto, a formação da espécie com m/z 893 a partir dos iões com m/z 920, por perda de um fragmento neutro com 27 Da, embora improvável, não pode, *a priori*, ser excluída.

De forma a verificar não só a composição elementar proposta para o aducto com m/z 893 ($C_{38}H_{11}N_4OF_{15}Ga$), mas também a composição elementar dos iões com m/z 920 ($C_{40}H_{16}N_5F_{15}Ga$) e m/z 875 ($C_{38}H_9N_4F_{15}Ga$), foram realizadas determinações de massa exacta. Os dados obtidos são apresentados nas tabelas **5**, **6** e **7**.

Tabela 5 - Resultados das determinações de massas exactas obtidos para os iões com m/z 875

	Corrol	
	2	3
Composição Elementar	Desvio /ppm	
C₃₈H₉N₄F₁₅Ga	3.1	0.7
C₄₀H₉N₅F₁₃Ga	- 4.0	- 6.4
C₃₉H₁₁N₃F₁₅Ga	-11.2	- 13.6
C₃₇H₇N₅F₁₅Ga	17.5	15.1

Tabela 6 - Resultados das determinações de massas exactas obtidos para os iões com m/z 920

	Corrol	
	2	3
Composição Elementar	Desvio /ppm	
C₄₀H₁₆N₅F₁₅Ga	- 1.0	0.3
C₄₀H₁₈N₄F₁₅Ga	- 14.6	- 13.3

Como se pode verificar, os desvios menores (<5 ppm) observam-se para as composições elementares propostas, validando as fórmulas propostas para $[(M-py)+H-(CH_3)_2NH]^+$ e $[(M-py)+H]^+$, iões com m/z 875 e m/z 920, respectivamente.

Tabela 7 - Resultados das determinações de massas exactas obtidos para os iões com m/z 893

	Corrol	
	2	3
Composição elemental	Desvio /ppm	
C₃₈H₁₁N₄OF₁₅Ga	2.0	2.1
C₃₈H₁₃N₅F₁₅Ga	-24.6	-24.3
C₃₉H₁₅N₄F₁₅Ga	-38.6	-38.4

No caso específico dos iões com m/z 893 os desvios obtidos para as composições elementares $C_{38}H_{13}N_5F_{15}Ga$ e $C_{39}H_{15}N_4F_{15}Ga$, correspondentes a perdas de 27 Da, a partir do ião com m/z 920, são muito elevados quando comparados com os valores obtidos para a composição elementar proposta, o que exclui a formação daqueles iões por estas últimas vias.

Assim, assumimos que as fórmulas elementares para os iões com m/z 920, m/z 875 e m/z 893, são $[(M-py)+H]^+$, $[(M-py)+H-(CH_3)_2NH]^+$ e $[(M-py)+H-(CH_3)_2NH+H_2O]^+$, respectivamente (tabela 8).

Tabela 8 - Composições elementares, fórmulas propostas e razões massa/carga dos iões em discussão

Composição Elementar	Fórmula	Razão massa/carga (m/z)
$C_{40}H_{16}N_5F_{15}Ga$	$[(M-py)+H]^+$	920
$C_{38}H_{11}N_4OF_{15}Ga$	$[(M-py)+H-(CH_3)_2NH+H_2O]^+$	893
$C_{38}H_9N_4F_{15}Ga$	$[(M-py)+H-(CH_3)_2NH]^+$	875

3.2.1.2 - Espectros de iões-produto

Os espectros de iões-produto (MS^2) dos iões com m/z 920, $[(M-py)+H]^+$, foram adquiridos, nos dois espectrómetros de massa, para os dois isómeros. Os espectros obtidos com o Q-ToF são muito semelhantes entre si: observam-se os sinais correspondentes aos iões com m/z 875 e aos seus aductos com uma molécula de água, com m/z 893.

Os espectros correspondentes obtidos na trapa de iões são também semelhantes para ambos os compostos, sendo observados como fragmentos maioritários os iões com m/z 875, $[(M-py)+H-(CH_3)_2NH]^+$ e estando os sinais correspondentes aos aductos com m/z 893 ausentes. Como é óbvio a diferenciação entre os dois isómeros não pode ser feita através dos espectros acima descritos.

Foram então adquiridos, nas mesmas condições experimentais, os espectros de iões-produto dos iões $[(M\text{-py})+H\text{-(CH}_3)_2\text{NH}]^+$, m/z 875. Em contraste com a semelhança dos resultados obtidos para os iões com m/z 920, os resultados dos espectros de iões-produto dos precursores com m/z 875 são muito diferentes e podem ser usados para diferenciar os isómeros (figura 46).

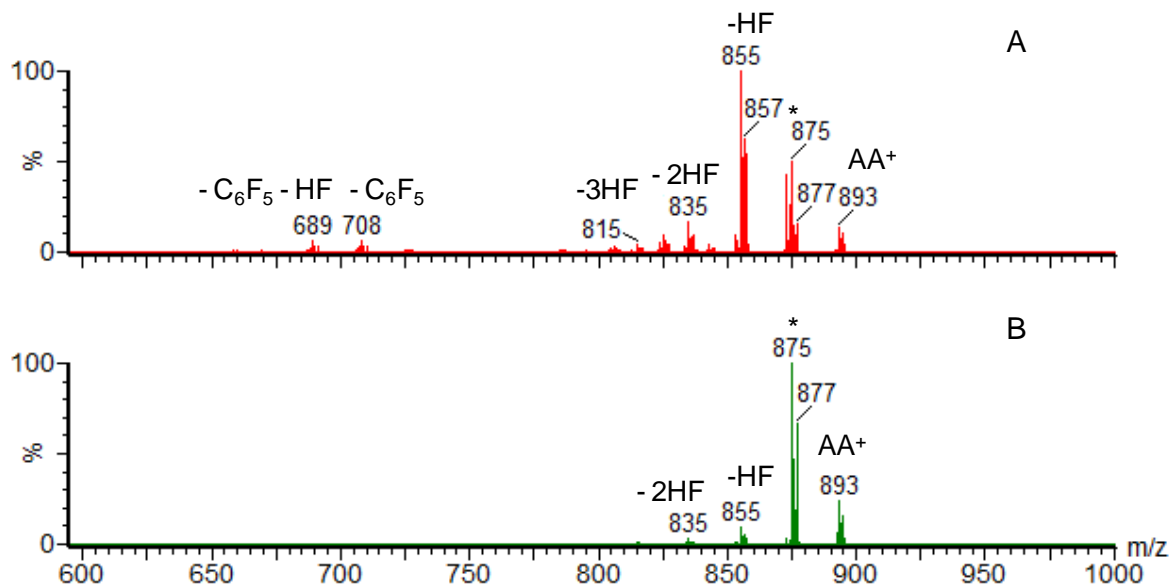


Figura 46 - Espectro de iões-produto dos iões com m/z 875 (* - ião precursor)

A - corrol 2, B - corrol 3; AA^+ - $[(M\text{-py})+H\text{-(CH}_3)_2\text{NH}+H_2O]^+$

Como se pode verificar na figura anterior, o ião-produto mais abundante para o corrol 2 é o ião com m/z 855, formado pela perda de uma molécula de HF. No entanto, no caso do corrol 3, o ião com m/z 855 tem uma abundância relativa baixa e o ião precursor permanece quase intacto. Os aductos $[(M\text{-py})+H\text{-(CH}_3)_2\text{NH}+H_2O]^+$, m/z 893, são observados para ambos os isómeros.

A formação de aductos com uma e mais moléculas de solvente, durante o processo de ionização por Electrospray não é uma ocorrência rara, tendo sido mesmo estudada a cinética da adição de acetonitrilo a catiões benzilo numa trapa de iões com ionização por Electrospray.⁵⁶ No entanto, a adição de solvente após a selecção do ião precursor na célula de colisões é um fenómeno muito pouco comum. Existem apenas alguns casos descritos de adição de água a iões precursores⁵⁷ ou fragmentos⁵⁸⁻⁶⁰ nas condições atrás descritas.

A observação dos aductos $[(M\text{-py})+H\text{-(CH}_3)_2\text{NH+H}_2\text{O}]^+$ nos espectros de iões-produto dos iões com m/z 875, apontam para que seja o árgon (gás usado na célula de colisões) a origem da água associada. Esta hipótese foi confirmada através da selecção dos iões com m/z 875 e aquisição dos seus espectros de iões-produto, na ausência de árgon na célula de colisões. Como esperado, não foram observados iões com m/z 893, o que nos permitiu confirmar a hipótese proposta.

Foram também adquiridos, na trapa de iões, os espectros de MS^3 ($920 \rightarrow 875 \rightarrow$ iões-produto), para os dois isómeros, a diferentes valores de energia de colisão normalizada, 60% e 85%, (tabela 9).

Quando foram adquiridos os espectros de MS^3 ($920 \rightarrow 875 \rightarrow$ iões-produto) a 60% da energia de colisão normalizada, observou-se, para os dois isómeros, um padrão de fragmentação semelhante ao observado nos espectros de MS^2 do ião com m/z 875 adquiridos no instrumento Q-ToF (figura 46). No entanto, a uma percentagem superior da energia de colisão normalizada, 85%, as diferenças entre os espectros dos dois isómeros diminuem drasticamente e os iões com m/z 855 são os iões com maior abundância relativa em ambos os casos (tabela 9).

Tabela 9 - Dados obtidos nos espectros de MS^3 ($920 \rightarrow 875 \rightarrow$ iões-produto) para os corróis 2 e 3 a 60% e 85% de energia de colisão normalizada

Corrol	Energia de Colisão					
	60 %			85 %		
	<i>m/z e abundâncias relativas %</i>					
	835	855	875	835	855	875
2	10	100	30	10	100	5
3	1	10	100	15	100	25

Os resultados obtidos apontavam para estruturas e estabilidades diferentes para os iões com m/z 855, sendo a estabilidade da estrutura iónica isomérica com m/z 855 para o corrol 2 superior à do seu homólogo 3.

3.2.1.3 - Curvas de decaimento

Para confirmar estas tendências foram realizadas experiências de espectrometria de massa com resolução de energia⁶¹ (*energy resolved mass spectrometry*) para a obtenção de curvas de decaimento (*breakdown graphs*). Os iões $[(M\text{-pir})+H-(CH_3)_2NH]^+$, m/z 875, foram seleccionados e submetidos a colisões numa gama de valores de energias entre 20 e 70 eV. As curvas de decaimento obtidas são apresentadas nas figuras 47 e 48.

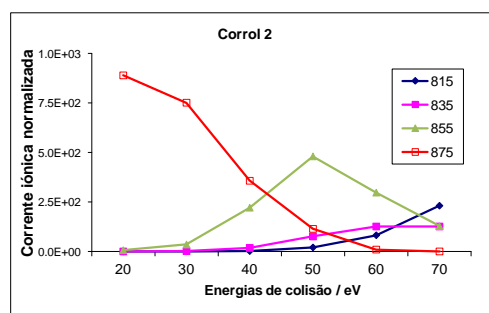


Figura 47 - Curvas de decaimento dos iões com m/z 875 formados a partir do corrol 2 (corrente iónica normalizada vs energias de colisão dos iões-precursores e produtos)

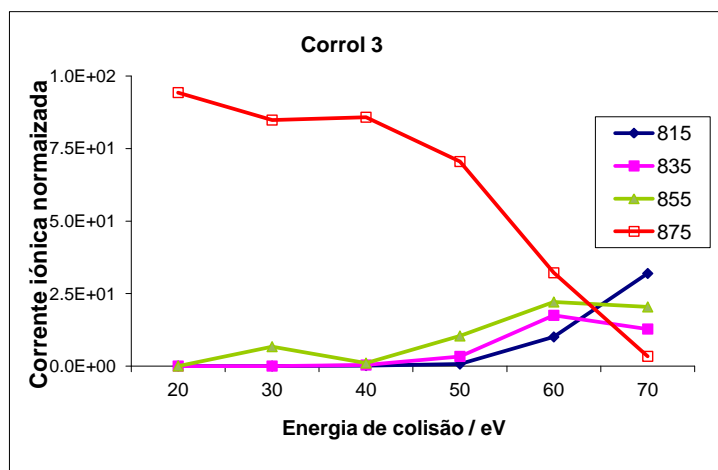


Figura 48 - Curvas de decaimento dos iões com m/z 875 formados a partir do corrol 3 (corrente iónica normalizada vs energias de colisão dos iões-precursores e produtos)

Como se pode verificar nessas mesmas figuras, a formação do ião de m/z 855, $[(M-py)+H-(CH_3)_2NH-HF]^+$, por perda de uma molécula de HF, é o processo de dissociação dominante para o corrol **2**. No caso do corrol **3**, a formação dos iões $[(M-py)+H-(CH_3)_2NH-2HF]^+$, m/z 835, e $[(M-py)+H-(CH_3)_2NH-3HF]^+$, m/z 815, por eliminação de duas e três moléculas de fluoreto de hidrogénio compete com a formação do ião com m/z 855. As abundâncias relativas dos iões com m/z 855 para o corrol **2** são superiores às do ião com m/z 855 no caso do corrol **3**, nomeadamente no intervalo de energias de colisão entre 40 e 60 eV, o que confirma a hipótese apresentada de estruturas com estabilidades diferentes para os referidos iões dos dois isómeros.

Para um melhor entendimento do processo de adição de água na célula de colisões foram também realizadas experiências de espectrometria de massa com resolução de energia para a obtenção de curvas de decaimento dos iões $[(M-py)+H]^+$, m/z 920. Estes iões foram seleccionados e submetidos a colisões numa gama de valores de energias entre 40 e 80 eV. Os resultados obtidos, para os dois isómeros, são apresentados nas figuras **49** e **50**.

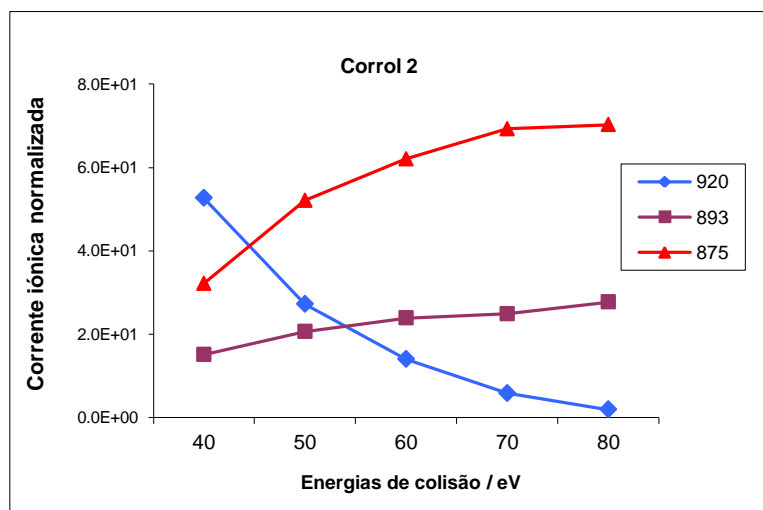


Figura 49 - Curvas de decaimento dos iões com m/z 920 formados a partir do corrol **2** (corrente iónica normalizada vs energias de colisão dos iões-precursores e produtos)

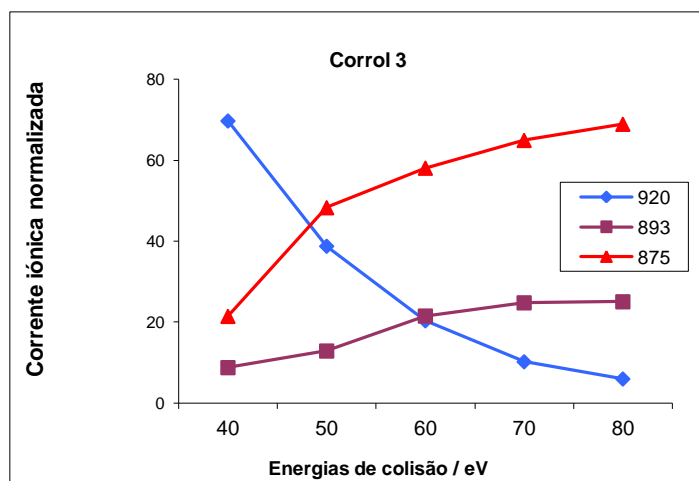


Figura 50 - Curvas de decaimento dos íons com m/z 920 formados a partir do corrol **3** (corrente iônica normalizada vs energias de colisão dos íons-precursores e produtos)

As tendências gerais para ambos os compostos são semelhantes. A abundância relativa dos íons com m/z 893 aumenta muito pouco com o aumento da energia de colisão, mas em contra-partida, há um aumento acentuado da abundância relativa dos íons-fragmento com m/z 875 com o aumento da energia de colisão. Foi sugerido que, quando ocorre adição de água na célula de colisões, o gás inerte tem um papel fundamental, pois permite a redução da energia interna dos íons aos quais a água é adicionada, para valores termalizados ou quase termalizados.⁵⁷ Se admitirmos esta hipótese, a análise dos gráficos anteriores permite-nos concluir que apenas uma parte dos íons com m/z 875 reage para formar os íons com m/z 893, o que indica que a abundância relativa destes últimos é condicionada pela pressão parcial da água na mistura gasosa da célula de colisões.

Na tentativa de obter mais informações sobre as estruturas dos aductos com m/z 893, formados durante o processo de ionização, foram adquiridos no Q-ToF os seus espectros de íons-produto. As abundâncias relativas dos íons-produto para ambos os isómeros, nas mesmas condições experimentais, é apresentada na figura **51**.

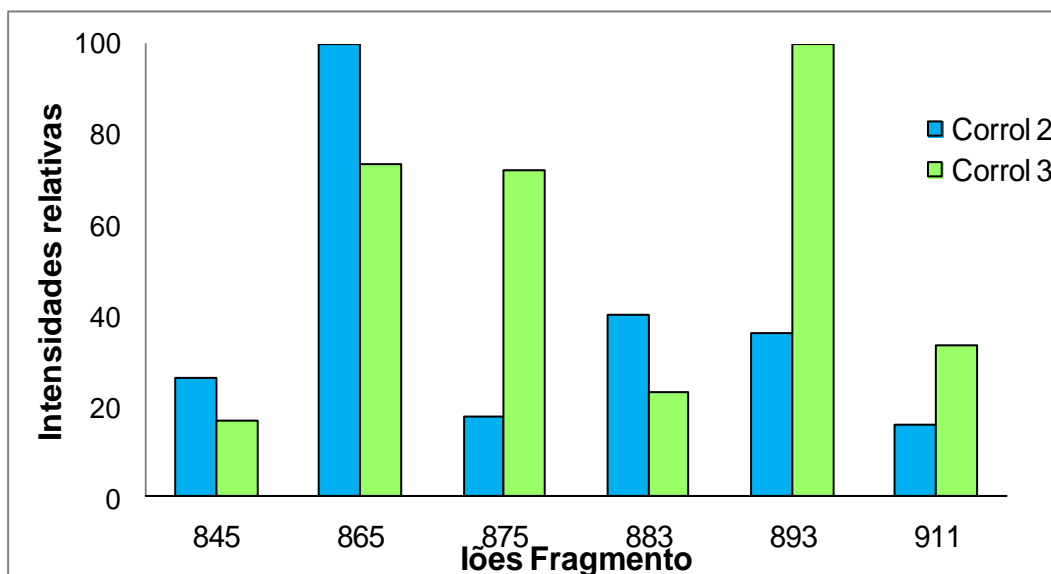
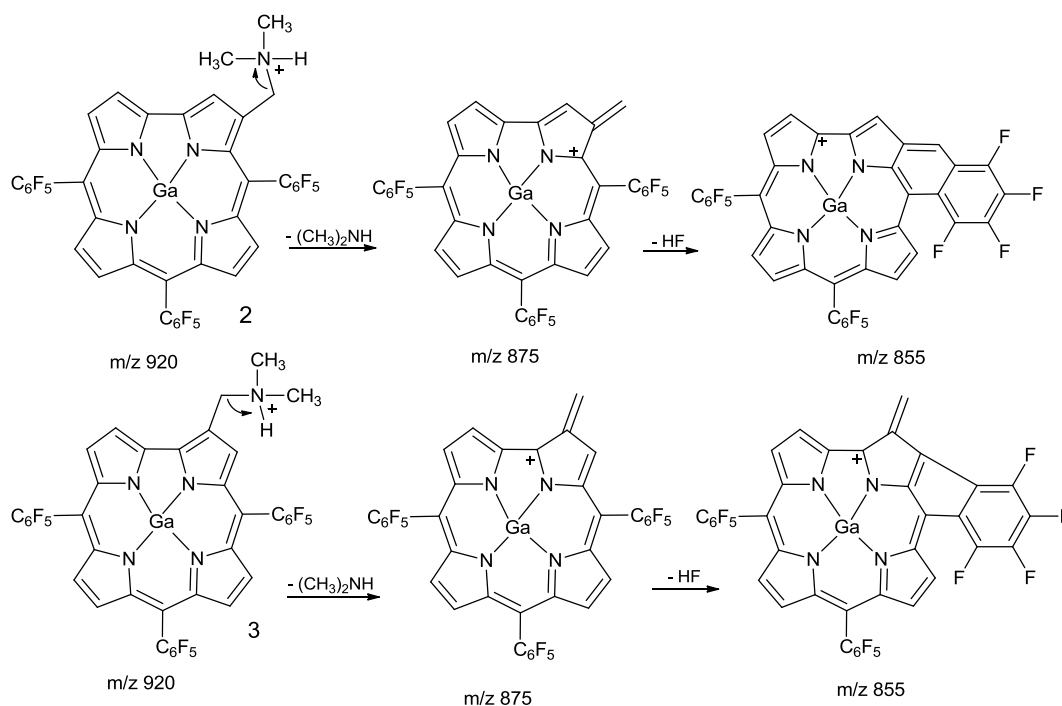


Figura 51 - Abundâncias relativas dos iões-produto dos aductos $[(M-py)+H-(CH_3)_2NH+H_2O]^+$, m/z 893, para os corróis **2** e **3**

Para o corrol **2**, o ião com m/z 865 é o fragmento mais abundante, no entanto, para o corrol **3**, os iões com m/z 865 e 875 apresentam aproximadamente a mesma abundância relativa. No caso do corrol **2**, formam-se, para além do ião com m/z 865, outros iões-fragmento relativamente abundantes, tais como os iões com m/z 845 e 883. O primeiro poderá ser formado pela eliminação de uma molécula de fluoreto de hidrogénio a partir do ião com m/z 865, o outro poderá resultar da adição de uma molécula de água a este mesmo ião. Foram também observados, para ambos os isómeros, os iões com m/z 911, de fórmula geral $[(M-py)+H]-(CH_3)_2NH+2H_2O]^+$, que podem ser atribuídos à adição de duas moléculas de água aos iões com m/z 875.

3.2.1.4 - Mecanismos de fragmentação

Os espectros de iões-produto dos iões $[(M-py)-H]^+$, m/z 920, adquiridos com qualquer dos espectrómetros de massa, não permitem a diferenciação dos dois isómeros, uma vez que a eliminação de dimetilamina, conduz à formação de dois iões-fragmento com m/z 875, com estruturas muito semelhantes, estabilizados pela deslocalização da carga positiva (esquema **8**).

**Esquema 8**

No entanto, os isômeros podem ser diferenciados através dos espectros de MS^3 ($920 \rightarrow 875 \rightarrow$ íões-produto) e dos espectros de íões-produto dos íões com m/z 875 e m/z 893 (aductos com água).

As diferenças observadas nos espectros de MS^3 e MS^2 (figura 46) bem como nas experiências de espectrometria de massa com resolução de energia para os íões com m/z 875 (figuras 47 e 48), podem ser explicadas se assumirmos que a perda de fluoreto de hidrogênio leva à formação de íões com m/z 855 com estruturas diferentes (esquema 8).

A formação de anéis de cinco membros, por perdas de HF , foi já descrita para corróis, porfirinas e outros.^{53,62,63} No presente caso, o íon com m/z 855, para o corrol 3, deve ser formado por este tipo de mecanismo (esquema 8, mecanismo superior). Para o corrol 2, uma vez que os vários resultados obtidos apontam para uma estrutura mais estável, propomos que a perda de HF a partir dos íões com m/z 875 dê origem à formação de um anel de seis membros (esquema 8, mecanismo inferior).

3.2.1.5 - Mecanismos de formação dos aductos com água

No que respeita à adição de água, que ocorre apenas no espectrómetro de massa Q-ToF, a coordenação das moléculas de água ao centro metálico é a ocorrência mais provável. No entanto, os diferentes espectros de iões-produto dos iões com m/z 893 sugerem outras possibilidades, tais como a formação de complexos ião-molécula estáveis, nas zonas com maior carga positiva (menor densidade electrónica). A adição da segunda molécula de água com a formação do ião com m/z 911, $[(M-py)+H-(CH_3)_2NH+2H_2O]$, pode verificar-se quer no centro metálico quer noutros locais positivamente carregados dos macrociclos.

Um processo semelhante consistindo na eliminação de uma molécula de NH_3 seguida de adição nucleófila de uma molécula de água foi descrito para a molécula protonada da 5-amino-1H-imidazol-4-carboxamida.⁵⁸ No caso presente, a adição nucleófila de uma molécula de água poderá ocorrer nos carbocatiões formados após a eliminação de dimetilamina (m/z 875). A adição de uma molécula de água, na posição 3¹ para o corrol **2** e nas posições 2¹ para o corrol **3** (esquema 7), seguida pela eliminação de CO ou C_2H_4 poderá ser a origem dos iões-fragmento com m/z 865.

3.2.1.6 - Cálculos semi-empíricos

Para uma melhor elucidação dos mecanismos em fase gasosa e das estruturas propostas para os iões, foram feitos cálculos semi-empíricos. As entalpias de formação para os iões m/z 920, m/z 875 e m/z 855 (este último com as estruturas propostas no esquema 8 e figura 52) são apresentados na tabela 10.

Tabela 10 - Entalpias de formação calculadas para os iões $[(M\text{-py})\text{-H}]^+$, $[(M\text{-py})\text{-H}\text{-}(\text{CH}_3)_2\text{NH}]^+$ e $[(M\text{-py})\text{-H}\text{-}(\text{CH}_3)_2\text{NH}\text{-HF}]^+$

Iões	Entalpias de Formação / kcalmol ⁻¹	
	Corrol 2	Corrol 3
<i>m/z</i>		
920	-300.9	-303.9
875	-272.5	-272.3
855	-230.6	-197.5

Como se pode observar, o valor da entalpia de formação para os iões com *m/z* 920 e *m/z* 875 é idêntico para ambos os isómeros.

No entanto verifica-se uma diferença significativa nas entalpias de formação dos iões com *m/z* 855, -230.6 kcal.mol⁻¹ e -197.5 kcal.mol⁻¹, respectivamente. Estes valores são consistentes com os dados obtidos anteriormente, nomeadamente com a abundância relativa superior do ião com *m/z* 855, observada para o corrol 2 nos espectros de iões-produto dos iões com *m/z* 875 (figura 46), nos espectros de MS³ (920→875→iões-produto) (tabela9) e nos gráficos das curvas de decaimento dos iões com *m/z* 875.

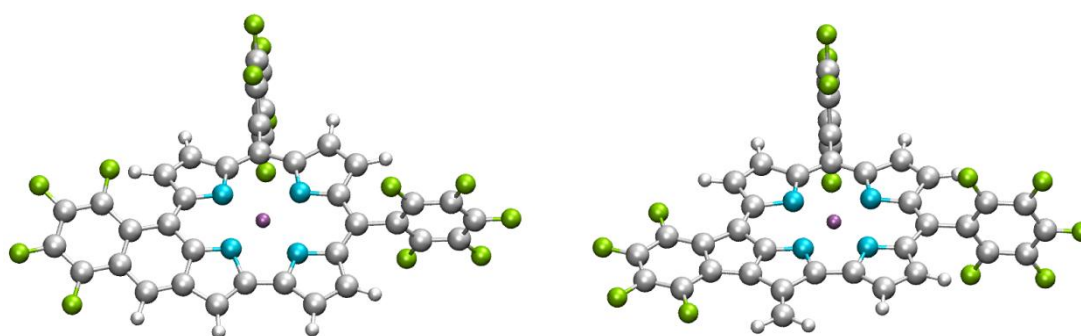


Figura 52 - Estruturas optimizadas dos iões com *m/z* 855; corrol 2 (lado esquerdo) e corrol 3 (lado direito)

As entalpias de formação para várias estruturas possíveis do aducto com *m/z* 893 também foram determinadas. Os valores mais baixos correspondem, como esperado, aos iões nos quais a molécula de água se situa sobre o átomo de gálio (tabela 11 e figura 53, estruturas a).

Tabela 11 - Entalpias de formação para os iões com m/z 893

Iões	Formation enthalpy / kcalmol ⁻¹	
	Corrol 2	Corrol 3
m/z e estruturas		
893 – estrutura a	- 362.1	- 361.7
893 – estrutura b	- 330.0	- 329.6

Como os diferentes padrões de fragmentação observados nos espectros de iões-produto dos iões com m/z 893 sugeriam a formação de espécies isoméricas estruturalmente diferentes, foram também calculadas as entalpias de formação para as estruturas b (Tabela 11 e Figura 53), nas quais a molécula de água está localizada perto das cargas positivas, supostamente localizadas nas posições 2¹ e 3¹, não tendo sido, no entanto, encontradas diferenças significativas.

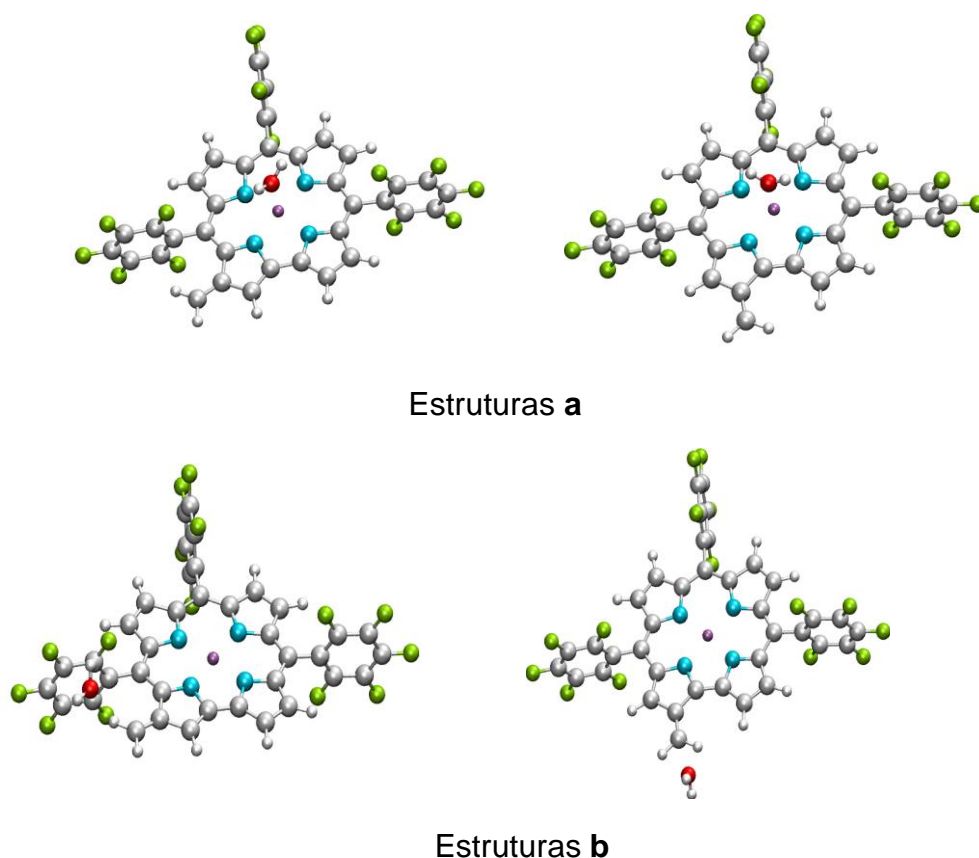


Figura 53 - Estruturas optimizadas dos iões com m/z 893; esquerda - corrol 2 e direita - corrol 3

3.2.2 - Estudos no modo de íões negativos

3.2.2.1 - Espectros de massa

Nos espectros de massa obtidos em ambos os instrumentos, Q-ToF e trapa de íões, operando no modo de íões negativos e utilizando metanol como eluente, os sinais mais abundantes, identificados para os dois isómeros, correspondem aos íões aducto, $[(M\text{-py})+\text{CH}_3\text{O}]^-$ ou $[M']^-$, com m/z 950, nos quais as moléculas de piridina axial foram substituídas por íões metóxido, CH_3O^- . Na figura 54 são apresentados os padrões experimentais e teórico obtidos, para os íões com m/z 950, para os dois isómeros.

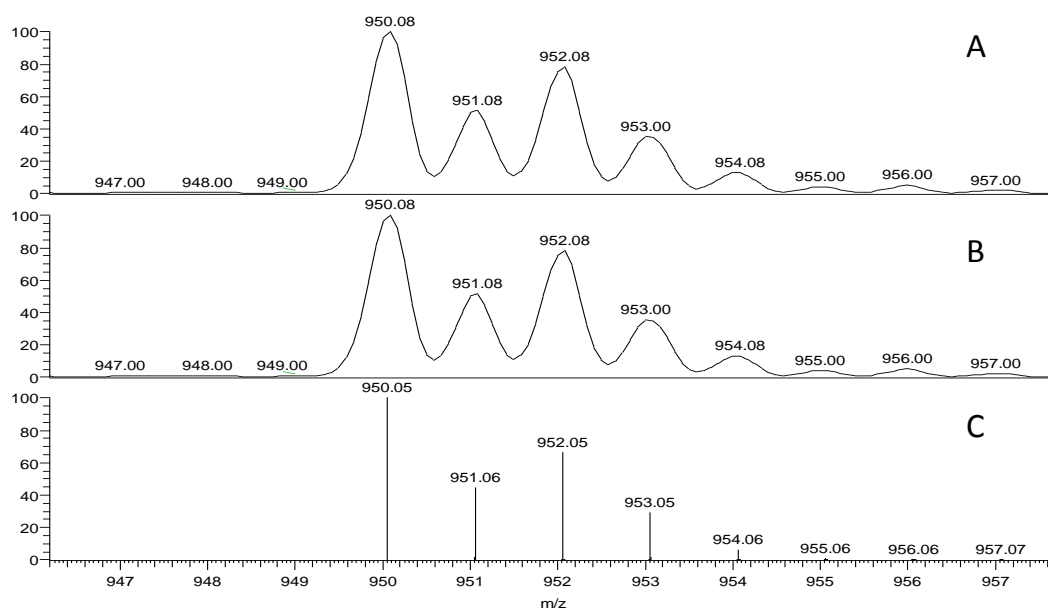


Figura 54 - Padrões isotópicos do íão com m/z 950

A e B - padrões experimentais para os corróis **2** e **3**, respectivamente; C - padrão teórico

Para confirmar a formação destes aductos, as amostras foram novamente analisadas, na trapa de íões, usando metanol deuterado, CD_3OD , como eluente e, como se previa, observou-se a formação dos aductos $[(M\text{-py})+\text{CD}_3\text{O}]^-$ para ambos os corróis.

3.2.2.2 - Espectros de iões-produto

Os espectros de iões-produto dos aductos $[M']^-$, m/z 950, foram também adquiridos para os dois isómeros, com ambos os instrumentos.

Nos espectros adquiridos no Q-ToF o fragmento mais abundante para o corrol **2** é ião com m/z 886, $[M'-(CH_3)_2N'-HF]^-$ enquanto que para o corrol **3** o fragmento mais abundante é o ião com m/z 906, $[M'-(CH_3)_2N]^-$. Para o corrol **3** a perda do radical neutro CH_3O^\bullet origina o ião com m/z 875 $[M'-(CH_3)_2N-CH_3O]^-$. Este ião está praticamente ausente no espectro do corrol **2**.

Os segundos iões mais abundantes, para qualquer dos isómeros, correspondem aos fragmentos com m/z 855, $[M'-(CH_3)_2N-HF-CH_3O]^-$, nos quais também ocorreu perda de CH_3O^\bullet . A figura 55 mostra os espectros de iões-produto dos aductos com m/z 950, $[(M-py)+CH_3O]^-$ ou $[M']^-$, obtidos para os dois isómeros, nas mesmas condições experimentais, no Q-ToF.

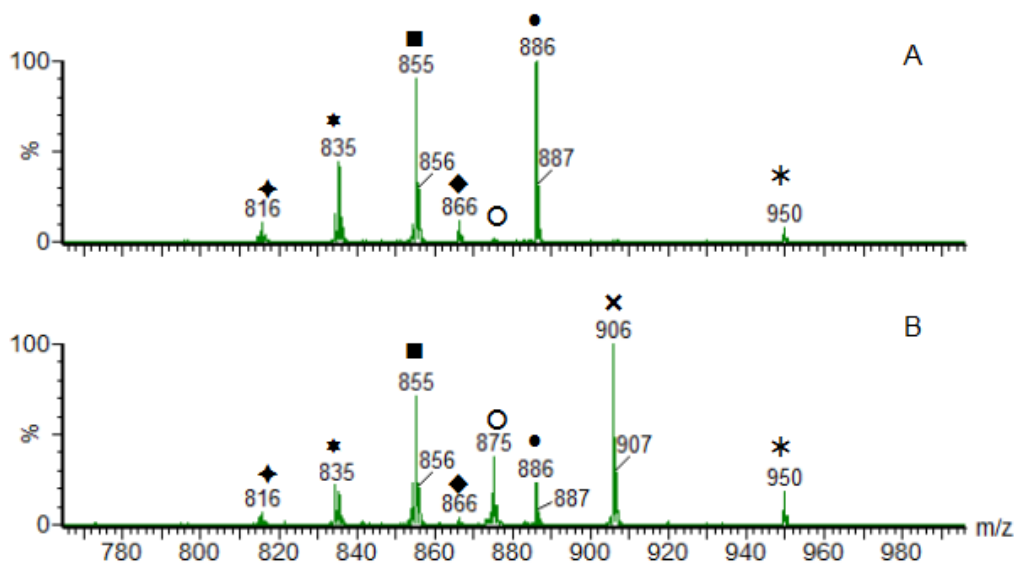


Figura 55 - Espectro de iões-produto dos aductos $[M']^-$ (m/z 950)

A - corrol **2**; B - corrol **3**; * - ião-precursor $[M']^-$

× - $\cdot N(CH_3)_2$; ● - $\cdot N(CH_3)_2-HF$; ○ - $\cdot N(CH_3)_2-\cdot OCH_3$; ◇ - $\cdot N(CH_3)_2-2HF$;

■ - $\cdot N(CH_3)_2-HF-\cdot OCH_3$; ★ - $\cdot N(CH_3)_2-2HF-\cdot OCH_3$; ◆ - $\cdot N(CH_3)_2-3HF-\cdot OCH_3$

No caso das experiências efectuadas na trapa de iões, os únicos iões-fragmento significativos observados nos espectros de iões-produto dos aductos $[M']^-$, m/z 950, são os iões $[M'-(CH_3)_2N-HF]^-$, m/z 886, para o corrol **2** e $[M'-(CH_3)_2N]^-$, m/z 906, para o corrol **3**.

Para ambos os compostos, os espectros de MS^3 , $M' \rightarrow [M'-(CH_3)_2N-HF]^- \rightarrow$ iões-produto ($950 \rightarrow 886 \rightarrow$ iões-produto) no caso do corrol **2** e $M' \rightarrow [M'-(CH_3)_2N]^- \rightarrow$ iões-produto ($950 \rightarrow 906 \rightarrow$ iões-produto) no caso do corrol **3**, foram também adquiridos (figura 56), tendo-se observado que os iões-fragmento mais abundantes, em qualquer dos casos, resultam da perda dos radicais CH_3O^\cdot , ou seja, $[M'-(CH_3)_2N-HF-CH_3O]^-$, m/z 855, para o corrol **2** e $[M'-(CH_3)_2N-CH_3O]^-$, m/z 875 para o corrol **3**.

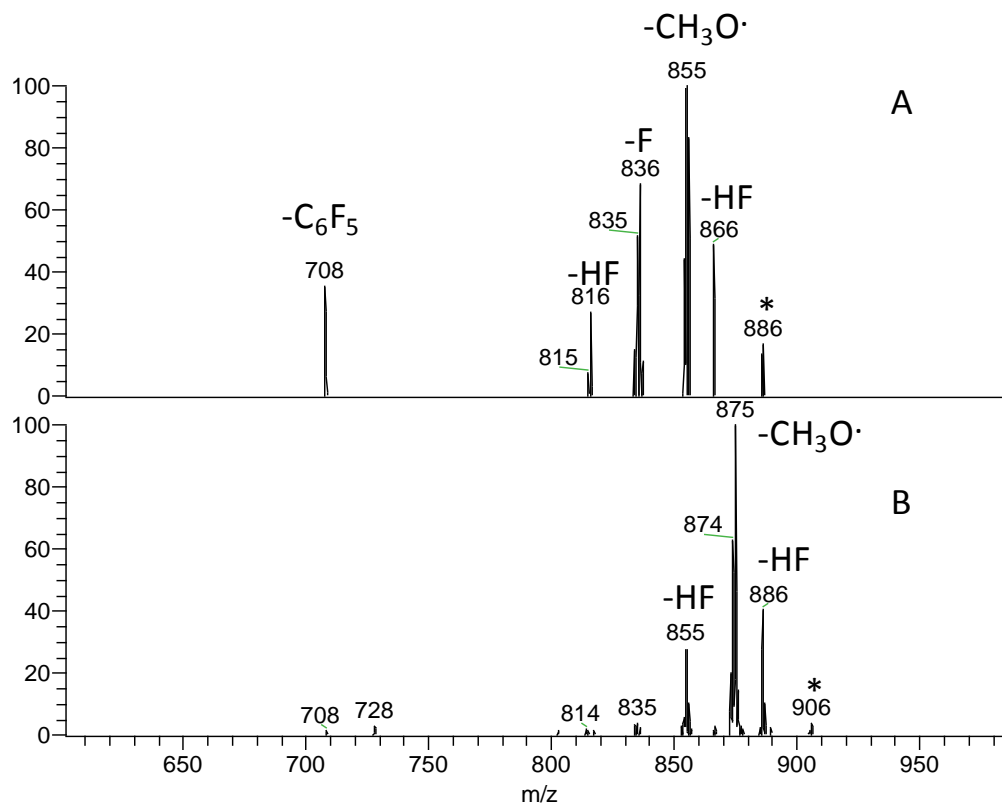
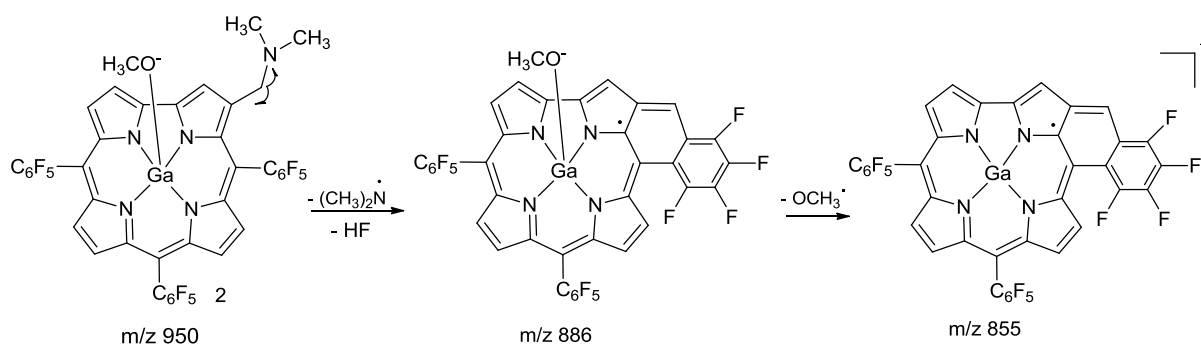


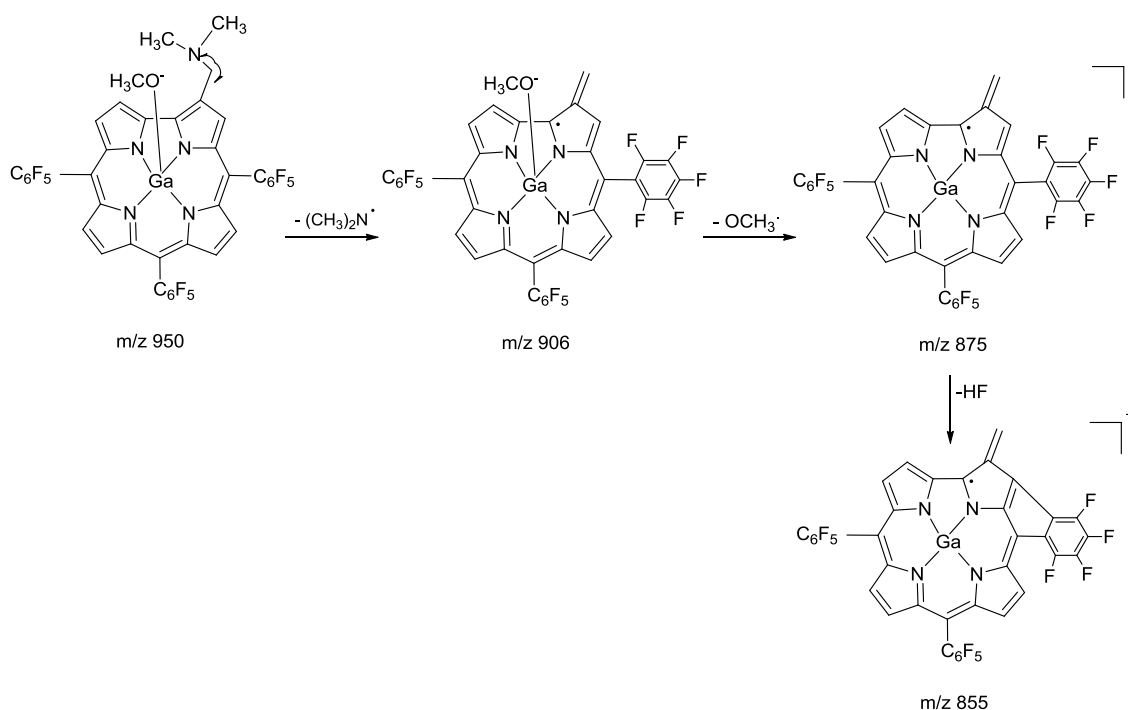
Figura 56 - Espectro de MS^3 de (* - segundo ião-precursor):

A - $M' \rightarrow [M'-(CH_3)_2N-HF]^- \rightarrow$ iões-produto ($950 \rightarrow 886 \rightarrow$ iões-produto) para o corrol **2**; B - $M' \rightarrow [M'-(CH_3)_2N]^- \rightarrow$ iões-produto ($950 \rightarrow 906 \rightarrow$ iões-produto) para o corrol **3**

A perda de $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$ ocorre provavelmente com uma diminuição do estado de oxidação do centro metálico. As perdas preferenciais de $^\bullet\text{N}(\text{CH}_3)_2$ and HF a partir do aducto $[(\text{M-py})+\text{CH}_3\text{O}^\bullet]$ no caso do corrol **2**, podem ser explicadas de um modo semelhante ao proposto para os iões positivos: formação de um anel de seis membros (esquema **9**). Como este processo não está disponível para o corrol **3**, a perda do radical $(\text{CH}_3)_2\text{N}^\bullet$ é o processo preferencial (esquema **10**).



Esquema 9



Esquema 10

3.3 - Conclusões

Os dois novos isómeros têm uma química em fase gasosa pouco comum e característica que pode ser usada para a sua diferenciação.

No modo de iões positivos, os processos de eliminação de dimetilamina e fluoreto de hidrogénio são as reacções-chave para a diferenciação dos dois isómeros, conduzindo à formação de estruturas isoméricas com entalpias de formação diferentes. A adição de água aos iões-fragmento, que poderá coordenar-se ao centro metálico, ou formar complexos ião-molécula com os catiões resultantes da dimetilamina, pode ser também usada para diferenciar os isómeros.

No modo de iões negativos, a diferenciação dos isómeros é feita através dos espectros de iões-produto dos seus aductos com o ião metóxido: à semelhança do que ocorre no modo de iões positivos, a eliminação de radicais dimetilamina e moléculas de fluoreto de hidrogénio conduz à formação de iões-diagnóstico que permitem a diferenciação de isómeros.

3.4 - Parte Experimental

Todos os solventes utilizados nas experiências de espectrometria de massa foram adquiridos de fontes comerciais e usados como adquiridos.

Síntese

O 5,10,15-tris-(pentafluorofenil)corrolatogálio(III)(piridina), **1**, foi preparado seguindo metodologias previamente descritas.²³ Os isómeros **2** e **3** foram sintetizados a partir do composto **1** com paraformaldeído e sarcosina de acordo com procedimentos descritos anteriormente.^{64,65}

Espectrometria de Massa

Os espectros de massa foram adquiridos com um espectrómetro de massa Micromass Q-ToF2 (Micromass, Manchester, Reino Unido), operando no modo de iões positivos, equipado com uma fonte de Z-spray, uma sonda de Electrospray e uma bomba de seringa. As temperaturas da fonte e de dessolvatação usadas foram, respectivamente, 80 °C e 150° C. A voltagem do capilar foi 3000 V. Os espectros foram adquiridos com uma resolução nominal de 9000 e voltagens de cone entre 20 e 80 V.

Os gases de nebulização e colisão usados foram N₂ e Ar, respectivamente. O fluxo de introdução da amostra utilizado foi de 10 µl min⁻¹. Os espectros de iões-produto (MS/MS) foram adquiridos através da selecção dos iões-precursores no quadrupolo e utilizando o hexapolo como célula de colisões. Foram usadas soluções de corróis, em metanol, com concentração aproximada de 10⁻⁶ mol dm⁻³. Nas medições de massa exacta com uma resolução de 9600 FWHM (full width at half maximum, largura à meia altura), foi utilizado, como ião de referência, a molécula protonada da 5-pentafluorofenil-10,15,20-trifenilporfirina (massa monoisotópica 900,1245 Da).

Os espectros de massa foram também adquiridos numa Finnigan Ion Trap LXQ (Thermo Finnigan, San Jose, CA, E.U.A.). A voltagem usada na fonte foi de 4,99 kV, a temperatura e a voltagem do capilar foram, respectivamente, 350 ° C e 1 V, a pressão do gás (azoto) de 30 psi e o fluxo de introdução da amostra de 8 $\mu\text{l min}^{-1}$. Os espectros correspondentes a várias etapas de fragmentação, MS^n , foram adquiridos através da selecção e excitação de iões específicos, usando procedimentos padrão.

3.5 - Cálculos teóricos para estruturas modelo

Os cálculos teóricos foram realizados em computadores com processadores Intel e sistemas operativos Linux. A geometria das diferentes estruturas foi otimizada com o programa MOPAC2007,⁶⁶ e cálculos posteriores utilizando matrizes Hessianas (matrizes contendo a segunda derivada da energia em relação às coordenadas nucleares) foram realizados para determinar a ordenação dos pontos críticos obtidos. Todos os cálculos efectuados com MOPAC2007 utilizaram o Hamiltoniano PM3,⁶⁷ mas sempre que necessário, o Hamiltoniano PM6^{68, 69} foi utilizado para confirmar a estruturas obtidas. Todas as optimizações das geometrias obtidas foram realizadas para gradientes inferiores a 0,01 kcal \AA^{-1} .

Cada estrutura tridimensional foi elaborada a partir da correspondente estrutura bidimensional, e depois minimizada. Posteriormente, a natureza do ponto crítico foi determinada a partir da observação dos valores próprios (eigenvalues) da respectiva matriz Hessiana: nos mínimos os valores próprios devem ter um valor positivo.

Estes cálculos foram realizados no Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, da Universidade de Coimbra pelos Doutores Paulo E. Abreu e Alberto A. C. C. Pais.

Bibliografia

- ¹ Whipple GH, Robscheit FS, Hooper CW. *Am. J. Physio.* **1920**; 53: 236
- ² Minot GR, Murphy WP. *J. Amer. Med. Ass.* **1926**; 87: 470
- ³ Rickes EL, Brink NG, Koniuszy FR, Wood TR, Folkers K. *Science.* **1948**; 107: 396
- ⁴ Pierce JV, Page AC, Stokstad ELR, Jukes TH. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**; 71: 2952
- ⁵ Hodgkin DC, Kamper J, Maureen M, Pickworth J, Trueblood KN, White JG. *Nature.* **1956**; 178: 64
- ⁶ <http://www.scientificpsychic.com/health/vitaminas-y-minerales.html> (em 21-01-2012)
- ⁷ Jonhson AW, Price RJ. *Chem. Soc.* **1960**: 1649
- ⁸ Jonhson AW, Kay ITJ. *Chem. Soc.* **1965**: 1620
- ⁹ Harrison DC, Hodder OJR, Hodgkin DCJ. *Chem. Soc. (B).* **1971**: 640
- ¹⁰ Milgrom LR. *The colours of life.* Oxford University Press. Oxford. **1997**. Pág. 4
- ¹¹ Ventura B, Degli Esposti A, Koszarna B, Gryko DT, Flamigni L. *New J. Chem.* **2005**; 29: 1559
- ¹² Ding T, Alemán EA, Modarelli DA, Ziegler CJ. *J. Phys. Chem. A* **2005**; 109: 7411

- ¹³ Ngo TH, Rossom WV, Dehaen W, Maes W. *Org. Biomol. Chem.* **2009**; 7: 439
- ¹⁴ Saltsman I, Mahammed A, Goldberg I, Tkachenko E, Botoshansky M, Gross Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**; 124: 7411
- ¹⁵ Paolesse R, Nardis S, Venanzi M, Mastroianni M, Russo M, Fronczek FR, Vicente MGH. *Chem. Eur. J.* **2003**; 9: 1192
- ¹⁶ Hiroto S, Hisaki I, Shinokubo H, Osuka A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**; 44: 6763
- ¹⁷ Barata JFB, Silva AMG, Neves MGPMS, Tomé AC, Silva AMS, Cavaleiro JAS. *Tetrahedron Lett.* **2006**; 47: 8171
- ¹⁸ Licoccia S, Di Vona ML, Paolesse RJ. *Org. Chem.* **1998**; 63: 3190
- ¹⁹ Paolesse R, Licoccia S, Bandoli G, Dolmella A, Boschi T. *Inorg. Chem.* **1994**; 33: 1171
- ²⁰ Gross Z, Galili N, Saltsman I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**; 38: 1427
- ²¹ Paolesse R, Jaquinod L, Nurco DJ, Mini S, Sagone F, Boschi T, Smith KM. *Chem. Commun.* **1999**: 1307
- ²² Ka J-W, Cho W.S, Lee C.H. *Tetrahedron Lett.* **2000**; 41: 8121
- ²³ Gryko DT, Koszarna B. *Org. Biomol. Chem.* **2003**; 1: 350
- ²⁴ Chauhan SMS, Kumari PJ. *Heterocyclic Chem.* **2008**; 45: 779
- ²⁵ Barata JFB, Silva AMG, Faustino MAF, Neves MGPMS, Tome AC, Silva AMS, Cavaleiro JAS. *Synlett* **2004**: 1291

- ²⁶ Barata JFB, Neves MGPMS, Tomé AC, Cavaleiro JAS. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2009**; 13: 415
- ²⁷ Vale LSHP, Barata JFB, Santos CIM, Neves MGPMS, Faustino MAF, Tomé AC, Silva MAS, Paz FAA, Cavaleiro JAS. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2009**; 13: 358
- ²⁸ Vale LSHP, Barata JFB, Neves MGPMS, Faustino MAF, Tomé AC, Silva MAS, Paz FAA, Cavaleiro JAS. *Tetrahedron Lett.* **2007**; 48: 8904
- ²⁹ Paolesse R, Nardis S, Sagone F, Khoury RG. *J. Org. Chem.* **2001**; 66: 550
- ³⁰ Gryko, D. T. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**: 1735
- ³¹ Nardis S, Monti D, Paolesse R. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2005**; 2: 355
- ³² Aviv I, Gross Z. *Chem. Commun.* **2007**: 1987
- ³³ Aviv-Harel I, Gross Z. *Chem. Eur. J.* **2009**; 15: 8382
- ³⁴ Paolesse R. *Synlett* **2008**; 15: 2215
- ³⁵ Gross Z, Gray HB. *Comm. Inorg. Chem.* **2006**; 27: 61
- ³⁶ Barbe J-M, Canard G, Brandès S, Guillard R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**; 44: 3103
- ³⁷ Verrelli G, Francioso L, Paolesse R, Siciliano P, Di Natale C, D'Amico A, Logrieco A. *Sensors Actuators B* **2007**; 123: 191
- ³⁸ Barbe JM, Canard G, Brandès S, Guillard R. *Chem. Eur. J.* **2007**; 13: 2118

- ³⁹ Tasior M, Gryko DT, Shen J, Kadish KM, Becherer T, Langhals H, Ventura B, Flamigni L. *J. Phys. Chem. C*, **2008**; 112: 19699
- ⁴⁰ Collman, J. P.; Kaplun, M.; Decreau, R. A. *Dalton Trans.* **2006**; 4: 554
- ⁴¹ Aviv I, Gross Z. *Chem. Eur. J.* **2008**; 14: 3995
- ⁴² Agadjanian H, Weaver JJ, Mahammed A, Rentsendorj A, Bass S, Kim J, Dmochowski IJ, Margalit R, Gray HB, Gross Z, Medina-Kauwe LK. *Pharm. Res.* **2006**; 23: 367
- ⁴³ Agadjanian H, Ma J, Rentsendorj A, Valluripalli V, Hwang JY, Mahammed A, Farkas DL, Gray HB, Gross Z, Medina-Kauwe LK. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**; 106: 6105
- ⁴⁴ Barata JFB, Neves MGPMS, Tomé AC, Faustino MAF, Silva AMS, Ramos CIV, Santana-Marques MGO, Cavaleiro JAS. *ICPP5-Fifth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines*. Moscovo, Rússia. **2008**. Pág. 297
- ⁴⁵ Cavaleiro JAS, Tomé AC, Neves MGPMS. *Handbook of Porphyrin Science (with applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine)*. World Scientific Publishing Co. Singapore. **2010**; 2: 193
- ⁴⁶ Gryko DT. *Chem. Commun.* **2000**: 2243
- ⁴⁷ Meier-Callahan AE, Gray HB, Gross Z. *Inorg. Chem.* **2000**; 39: 3605
- ⁴⁸ Zdilla MZ, Dexheimer JL, Abu-Omar MM. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**; 129: 11505

- ⁴⁹ Fu B, Zhang D, Weng X, Zhang M, Ma H, Ma Y, Zhou X. *Chem. Eur. J.* **2008**; *14*: 9431
- ⁵⁰ Broring M, Milsmann C, Ruck S, Kohler SJ. *Organomet. Chem.* **2009**; *694*: 1011
- ⁵¹ Zhan H-Y, Liu H-Y, Chen H-J, Jiang H-F. *Tetrahedron Lett.* **2009**; *50*: 2196
- ⁵² Schofberger W, Lengwin F, Reith LM, List , Knor G. *Inorg. Chem. Commun.* **2010**; *13*: 1187
- ⁵³ Lau KSF, Sadilek M, Gouterman M, Khalil GE, Bruckner C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**; *17*: 1306
- ⁵⁴ Barata JFB, Barros CM, Santana-Marques MGO, Neves MGPMS, Faustino MAF, Tomé AC, Ferrer-Correia AJ, Cavaleiro JAS. *J. Mass Spectrom.* **2007**; *42*: 225
- ⁵⁵ Swider P, Nowak-Krol A, Voloshchuk R, Lewtak JP, Gryko DT, Danikiewicz W. *J. Mass Spectrom.* **2010**; *452*: 1443
- ⁵⁶ Gabelica V, Lemaire D, Laprévote O, De Pauw E. *Int. J. Mass Spectrom.* **2001**; *210/211*: 113
- ⁵⁷ Seto C, Stone JA. *Int. J. Mass Spectrom.* **1999**; *192*: 289
- ⁵⁸ Horni A, Hesse M. *Helv. Chim. Acta* **1999**; *82*: 1969
- ⁵⁹ Khitrov GA, Strouse GF, Gaumet J-J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**; *15*: 260

- ⁶⁰ Izquierdo RA, Barros CMF, Amado FML, Santana-Marques MGO, Ferrer-Correia AJ, Madureira J, Santos TM, Félix V. *Int. J. Mass Spectrom.* **2005**; 243: 257
- ⁶¹ Harrison AG. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**; 13: 1663
- ⁶² Lau KSF, Sadilek M, Gouterman M, Khalil GE, Bruckner C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**; 16: 1915
- ⁶³ Izquierdo RA, Barros CM, Santana-Marques MGO, Ferrer-Correia AJ, Silva AMG, Tomé AC, Silva A, Neves MGPMS, Cavaleiro JAS. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**; 18: 2601
- ⁶⁴ Bendix J, Dmochowski IJ, Gray HB, Mahammed A, Simkhovich L, Gross Z. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**; 39: 4048
- ⁶⁵ Barata JFF. Dissertação de *Doutoramento*. Aveiro. 2009
- ⁶⁶ Stewart JJP. MOPAC2007, James J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, <http://OpenMOPAC.net> (2007)
- ⁶⁷ Stewart JJP. *J. Comp. Chem.* **1989**; 10: 209
- ⁶⁸ Stewart JJP. *J. Mol. Modeling* **2007**; 13: 1173
- ⁶⁹ Humphrey W, Dalke A, Schulten K. *J. Molec. Graphics* **1996**; 14: 33

CAPÍTULO 4.

ADN:

CONSTITUINTES E ESTRUTURAS

4.1 - Os ácidos nucleicos

Nos núcleos celulares milhares de nucleotídeos formam cadeias únicas de ácido desoxirribonucleico, o ADN. Um nucleotídeo é uma associação de uma base azotada, purina (adenosina, guanina) ou pirimidina (citosina e timina), um monossacarídeo (ribose ou desoxirribose) e uma molécula de ácido fosfórico¹ (figura 57). O conjunto constituído pela base azotada e pela pentose designa-se por nucleosídeo.

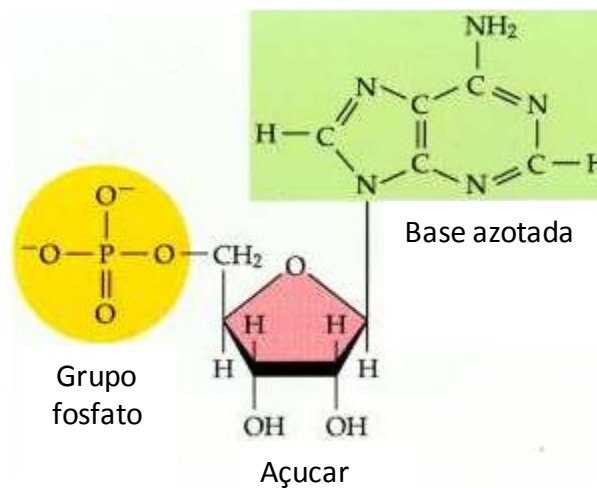


Figura 57 - Constituição de um nucleotídeo²

Os ácidos nucleicos são polímeros orgânicos lineares formados pelo encadeamento de quatro nucleotídeos, unidos por ligações fosfodiéster, entre o carbono 3' da pentose de um nucleotídeo e o carbono 5' da pentose do nucleotídeo adjacente³ (figura 58).

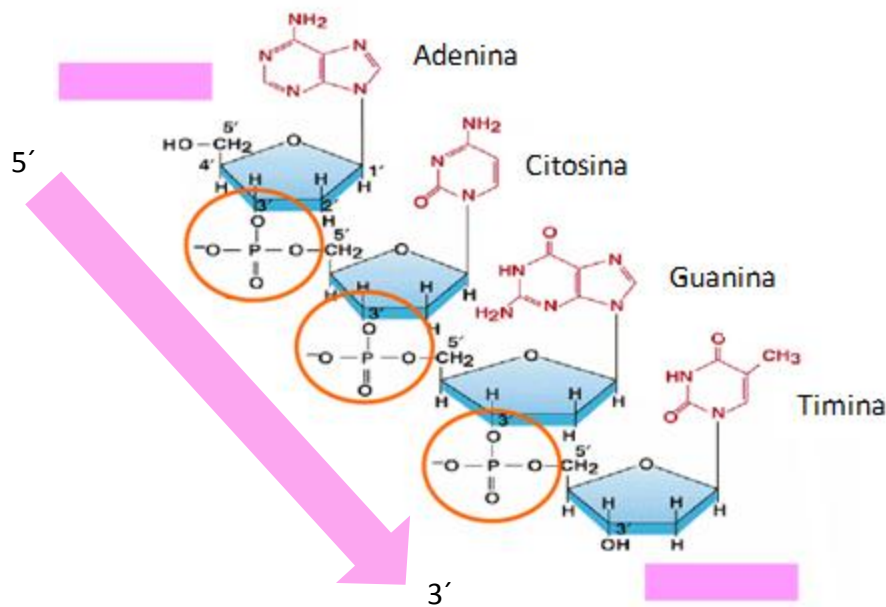


Figura 58 - Ligações fosfodiéster entre nucleotídeos⁴

As bases azotadas que entram na constituição dos ácidos nucleicos são derivadas das estruturas purina e pirimidina, sendo desta forma designadas por bases purínicas ou pirimidínicas, respectivamente. As bases purínicas são a adenina e a guanina, geralmente designadas por A e G, respectivamente, e as bases pirimidínicas são a timina e a citosina cujas abreviaturas são T e C respectivamente (figura 59).

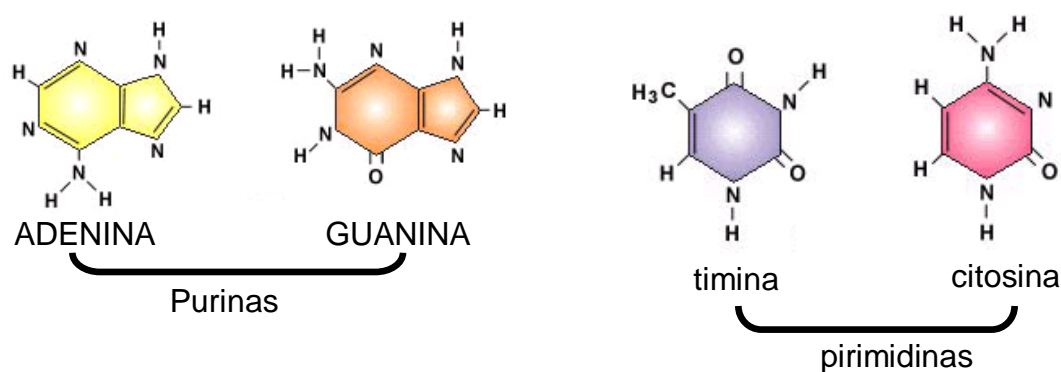


Figura 59 - Estruturas químicas das bases purínicas (adenina e guanina) e das bases pirimidínicas (timina e citosina)

Nestas bases, os electrões, envolvidos nas ligações π , deslocalizam-se por toda a estrutura cíclica, conferindo-lhe grande estabilidade.

Os açúcares dos ácidos nucleicos são, para o ADN a desoxirribose e para o ácido ribonucleico (ARN) a ribose, sendo estes os compostos que dão o nome aos ácidos nucleicos, uma vez que neles reside uma das suas diferenças estruturais. A ribose e a desoxirribose são pentoses cíclicas onde intervém o oxigénio, quer integrado no próprio ciclo, quer em grupos substituintes hidroxilo (OH).

O ácido fosfórico, outro dos constituintes dos ácidos nucleicos estabelece as ligações sucessivas entre as pentoses dos vários nucleósidos.

4.2 - A dupla hélice

As sequências lineares de oligonucleotídeos acumulam toda a informação genética de um organismo vivo. Entre 1949 e 1953, E. Chargaff e seus colaboradores aplicaram métodos cromatográficos quantitativos para separação e análise quantitativa das quatro bases obtidas por hidrólise de amostras de ADN, isoladas de várias espécies, e mostraram que, embora a composição em bases variasse de espécie para espécie, o número de adeninas era sempre igual ao de timinas e o número de guaninas era sempre igual ao de citosinas.

A equivalência entre as bases era indicativa de uma organização estrutural das moléculas de ADN e despoletou a realização de um grande número de estudos.

No início dos anos 50, estudos de Raios X efectuados por L. Pauling, nos EUA e por R. Franklin e M. H. F. Wilkins no Reino Unido mostraram que o ADN pode ter três formas A, B e Z. Estes estudos permitiram determinar que a forma B, biologicamente mais importante, possui duas periodicidades, uma principal, de 0.34 nm, e uma secundária de 3.4 nm.

Em 1953 J. D. Watson e F. H. C. Crick (figura 60), partindo da equivalência de bases observadas por Chargaff e dos dados de Raios X de Franklin e Wilkins, postularam um modelo tridimensional para a estrutura do ADN. Este modelo, para além de explicar muitas das propriedades físico-químicas do ADN, sugeria um mecanismo pelo qual a informação genética podia ser replicada com exactidão⁵.

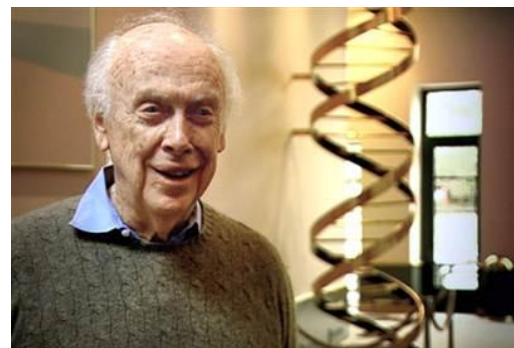
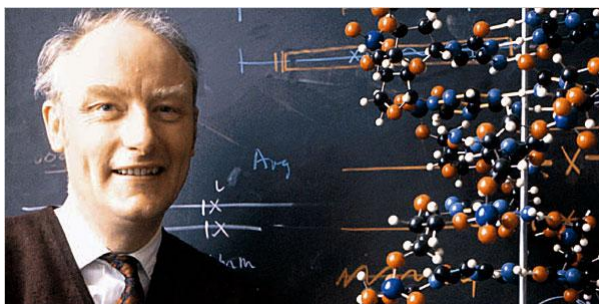


Figura 60 - Francis Crick e James Watson

O modelo de Watson-Crick, como ficou conhecido, consiste em duas cadeias polinucleotídicas dextrógiras, enroladas de forma helicoidal em redor do mesmo eixo, formando uma dupla hélice. As duas cadeias são anti-paralelas, isto é, as suas ligações 5'-3' seguem direcções opostas (figura 61).

As bases purínicas e pirimidínicas de cada cadeia estão fixadas no interior da dupla hélice, com os seus planos paralelos entre si e perpendiculares ao eixo longitudinal da dupla hélice. As duas cadeias estão unidas por ligações de hidrogénio estabelecidas entre os pares de bases.

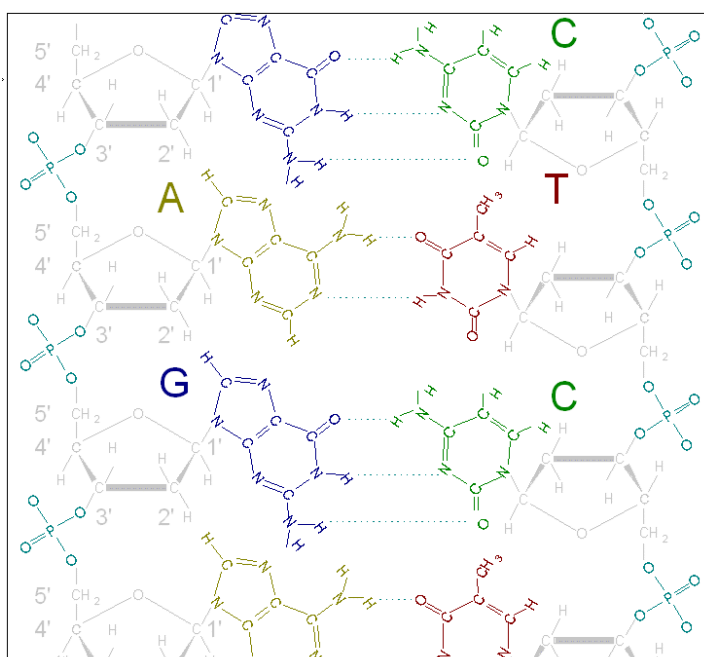


Figura 61 - Duas cadeias de ADN emparelhadas

Quando uma base se encontra livre, pode estabelecer uma ou várias ligações de hidrogénio com qualquer outra base; no entanto, a configuração da hélice é tal que o emparelhamento estável, obtido através da formação de mais do que uma ligação de hidrogénio (figuras 62 e 63), só pode ocorrer entre as bases adenina e timina (duas ligações de hidrogénio) ou guanina e citosina (três ligações de hidrogénio); diz-se então que a adenina e a timina são complementares, o mesmo acontecendo com a guanina e a citosina.⁶ De facto, a cada adenina numa cadeia corresponde uma timina noutra e vice-versa, o mesmo se verificando entre a guanina e a citosina. Desta forma, a sequência de bases

numa das cadeias determina a sequência na outra cadeia, sendo este fenómeno muito importante no processo de replicação do ADN.

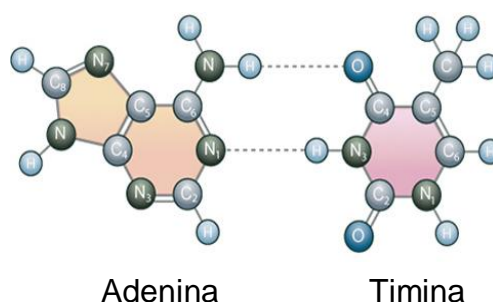


Figura 62 - Ligações estabelecidas entre os pares A e T (duas ligações de hidrogénio)⁷

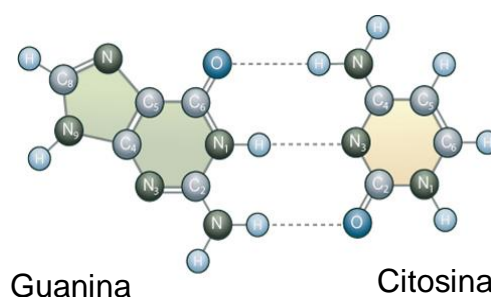


Figura 63 - Ligações estabelecidas entre os pares G e C (três ligações de hidrogénio).⁷

Os únicos dois pares possíveis são portanto os pares AT e GC. O par AG não se forma, uma vez que é muito grande para se acomodar dentro de uma hélice com uma espessura de 2 nm; por seu lado, no par CT as bases ficariam muito distantes para formar entre si ligações de hidrogénio estáveis. Portanto, a dupla hélice de Watson-Crick envolve o maior número possível de pares de bases ligadas por ligações de hidrogénio sendo, além disso, os pares formados, aqueles que permitem maior ajuste e estabilidade.

A dupla hélice é estabilizada não só pelas ligações de hidrogénio entre os pares de bases complementares como também por interações de van der Waals entre as bases empilhadas.

Na sua superfície exterior a dupla hélice contém dois sulcos profundos entre as ligações ribose - fosfato das cadeias. Estes dois sulcos apresentam

tamanhos diferentes e são denominados por sulco maior (*major groove*) e sulco menor (*minor groove*). A diferença de tamanhos está relacionada com a assimetria existente nos anéis do açúcar e com a diferença estrutural existente entre as superfícies superior e inferior dos diferentes pares de bases.

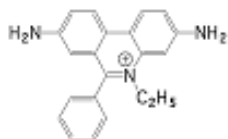
A interacção de ligandos com o ADN é fundamental para muitos processos intracelulares⁸ e tem sido objecto de intenso estudo desde meados do século passado. As características estruturais únicas das bases ao longo da hélice pentose-fosfato devidas ao empilhamento, relativamente planar, fazem do ADN uma estrutura única e são muito importantes em várias áreas científicas nomeadamente no desenvolvimento de novos fármacos.⁹

Devido à complexidade da estrutura da dupla hélice de ADN, já anteriormente referida quando esta interage com outras moléculas ou iões, para além de ligações covalentes, vários outros tipos de ligação podem ser formados. Os tipos de ligações não-covalentes que podem ocorrer são: intercalação entre os pares de bases¹⁰, bis-intercalação, ligação no sulco menor (*minor groove binding*), ligações no sulco maior (*major groove binding*), ligação externa com ou sem auto-empilhamento (*self-stacking*) e combinações destes.^{11,12}

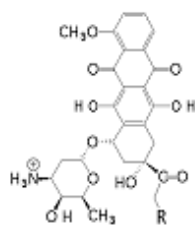
A intercalação é caracterizada pelo empilhamento não-covalente entre pares de bases adjacentes, por interacção com as orbitais π desses pares de bases, muitas vezes em combinação com ligações de hidrogénio.

Os intercaladores constituem uma importante classe de compostos que interagem com o ADN, e são compostos aromáticos heterocíclicos de várias classes. A figura **64** mostra a estrutura de alguns desses compostos.

Os ligantes no sulco menor (*minor groove binders*) geralmente estabelecem as suas interacções através de vários tipos de interacções não-covalentes: ligações de van der Waals, ligações de hidrogénio e interacções electrostáticas em zonas ricas em pares AT do ADN. No entanto, a ocorrência de ligações no sulco menor ocorre, na maior parte das vezes, através de ligações de hidrogénio entre os heteroátomos das bases adenina e timina e átomos específicos dos ligantes no sulco menor. Os ligantes no sulco maior (*major groove binders*) caracterizam-se pelo estabelecimento de interacções electrostáticas. Muitas proteínas e também alguns fármacos ligam-se no sulco maior do ADN.¹³

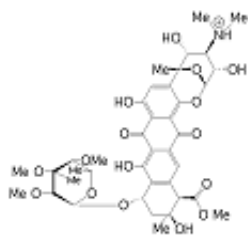


Brometo de Etídio

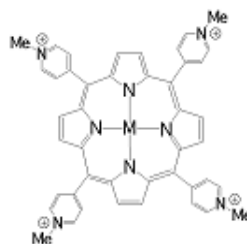


Daunomicina R=H;

Adrimicina R= OH



Nogalamicina



TMPyP₄

Figura 64 - Estrutura de alguns intercaladores

4.3 - Estruturas de ordem superior do ADN

A molécula de ADN é bastante maleável e desta forma pode adquirir uma grande variedade de estruturas secundárias. Duas das formas mais comuns são as estruturas de “hairpin” (que deve o seu nome à semelhança com os antigos ganchos de cabelo) e de “duplo hairpin” ou cruciformes (figura 65). A estrutura de “hairpin” é semelhante à estrutura globular das proteínas e resulta do “enrugamento” de uma cadeia simples, com formação de alguns pares de bases de Watson-Crick, formando uma estrutura que contém um corpo formado pelos pares de Watson-Crick e por uma “cabeça” com forma globular.

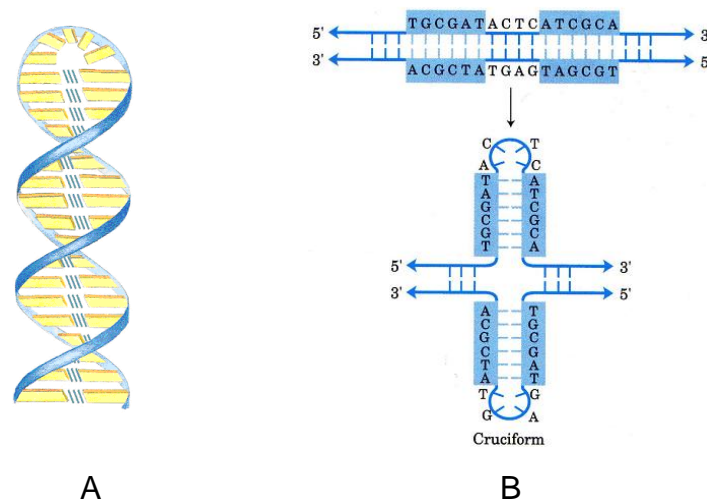


Figura 65 - Exemplos da estrutura de A - “hairpin”; B - cruciforme ou duplo “hairpin”¹⁴

Para além dos “hairpins” e das estruturas cruciformes, o ADN pode ainda encontrar-se na forma de triplexes ou quadruplexes, consoante três ou quatro cadeias se unam entre si, através de ligações de hidrogénio. Quando uma citosina protonada se liga a uma guanina do par de bases GC, ou quando a timina se liga à adenina do par de bases AT, surge uma estrutura designada por triplex. Nas figuras seguintes mostram-se exemplos das ligações em estruturas de triplex e de uma estrutura de triplex.

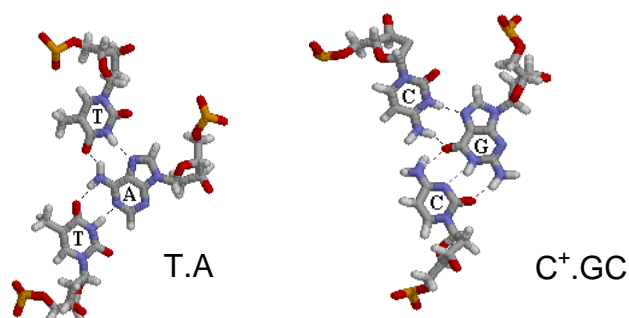


Figura 66 - Ligações estabelecidas para formação de uma estrutura de triplex¹⁵

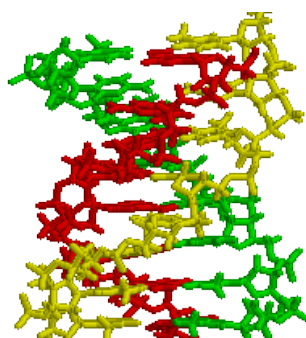


Figura 67 - Estrutura tridimensional de um triplex¹⁵

Quatro cadeias de ADN podem também ligar-se para formar um quadruplex ou tetraplex, porém estas estruturas são mais raras e apenas ocorrem em cadeias de ADN com uma apreciável quantidade de guanina, estando geralmente localizadas nas sequências terminais dos cromossomas de células eucarióticas, designados por telómeros.¹⁶ Na figura seguinte mostram-se exemplos das ligações em estruturas de quadruplex e de uma estrutura de quadruplex.

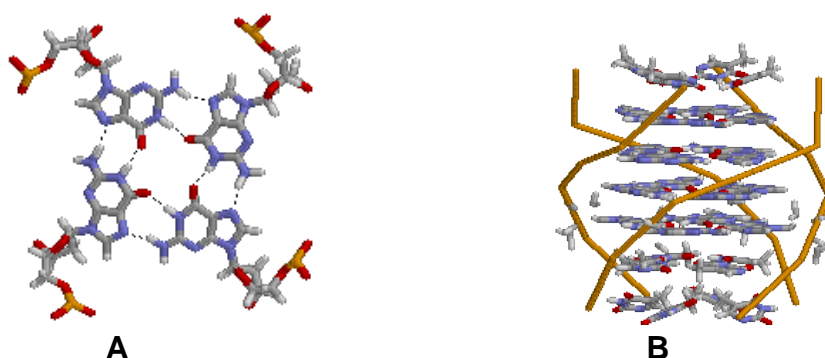


Figura 68 - A - Ligações estabelecidas para formação de uma estrutura de quadruplex; B - Estrutura tridimensional de um quadruplex¹⁵

A estrutura quaternária do ADN corresponde à interacção deste com proteínas - as histonas. Estas têm como função principal estabilizar o ADN numa forma compacta. Esta estabilização deve-se, principalmente a interacções electrostáticas entre os aminoácidos constituintes das cadeias laterais das histonas, carregados positivamente, e os grupos fosfato do ADN.

Os cromossomas são formados por cadeias de cromatina. A cromatina é constituída por uma cadeia dupla de ADN enrolada em torno de nucleossomas que são estruturas constituídas por quatro pares de histonas diferentes.

A cromatina tem o aspecto de um “colar de pérolas”, em que as “pérolas” são os nucleossomas e o ADN apresenta uma estrutura de solenóide (figura 69). Os cromossomas resultam do enrolamento do fio de cromatina e são visíveis ao microscópio.

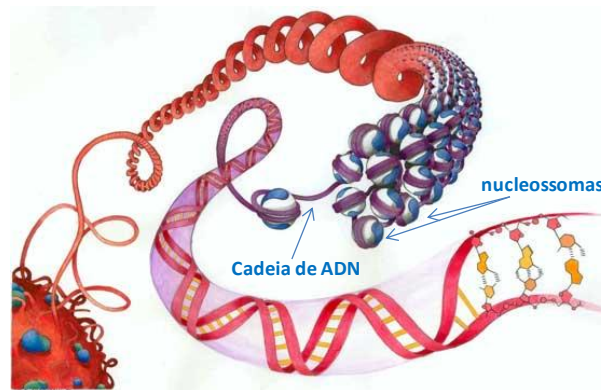


Figura 69 - Estrutura da cromatina¹⁷

O ADN encontra-se essencialmente no núcleo das células vegetais e animais ao nível dos cromossomas, embora se possa encontrar também nas mitocôndrias dessas mesmas células e nos cloroplastos dos organismos fotossintéticos.

Em resumo, a cadeia polirribonucleotídica é formada por um encadeamento em que alternam a ribose e o fosfato; as bases não participam no encadeamento, no entanto a sua sequência é característica de cada ácido nucleico e é nela que reside a toda informação genética.

4.4 - Telómeros, telomerase e G-quadruplexes

Os primeiros estudos e a descoberta dos telómeros¹⁸ reportam a 1938 quando H. Muller¹⁹ e posteriormente também B. McClintock, em 1941,²⁰ mostraram que as extremidades dos cromossomas são limitadas por uma estrutura designada telómero, nome dado por Muller e que provém do grego “telos” e “meros” que significam fim e parte, respectivamente. As suas principais funções são manter a estabilidade da estrutura do cromossoma, assegurar que a informação genética é perfeitamente copiada quando a célula se duplica, e impedir a junção de extremidades entre cromossomas consecutivos o que poderia conduzir à degradação do ADN, por acção de proteínas específicas ou à ocorrência de mutações genéticas e culminar no aparecimento de tumores²¹.

Na década de 1970, os mecanismos por detrás do processo de replicação do ADN foram sendo cada vez mais bem compreendidos. Assim, ficou claro que a ADN polimerase, a enzima responsável pela replicação do ADN, não poderia sintetizar totalmente a extremidade 3' do ADN linear. Em 1972, J. Watson designou este fenómeno como “*end-replication problem*”.^{22,23} Na mesma época, A. Olovnikov também identificou o problema de J. Watson e apresentou uma analogia curiosa baseada no metro de Moscovo: as linhas férreas representavam o ADN e o comboio representava a ADN polimerase. A. Olovnikov ainda foi mais longe ao propor que o “*end-replication problem*” iria resultar no encurtamento progressivo dos telómeros, a cada ciclo de replicação, e que esse mecanismo poderia ser a causa da senescência replicativa.^{24,25}

Provou-se mais tarde que, durante o processo de divisão celular, os telómeros sofrem encurtamento em função de interrupções no processo de replicação do ADN. Em homenagem ao cientista que fez a descoberta, o comprimento mínimo que os telómeros podem alcançar antes de deixar de ser possível a replicação celular passou a ser chamado por limite de Hayflick.²⁶

Para que a duplicação do ADN possa ser iniciada é necessária a introdução de um molde ou “primer” de ARN para que, a partir deste, a enzima DNA polimerase, faça a replicação. Numa das cadeias do ADN esse “primer” nunca é adicionado na região telomérica, e esta nunca é duplicada, ocorrendo

assim, o encurtamento sucessivo dos telómeros. Este encurtamento poderá traduzir-se na perda parcial ou total da capacidade de divisão da célula e/ou na eliminação de genes indispensáveis à sobrevivência da mesma. Ao longo de sucessivas divisões celulares, o tamanho dos telómeros vai diminuindo progressivamente^{27,28} e as células com telómeros curtos, que se encontram numa situação limite de mutação, são eliminadas, ficando o processo de renovação celular comprometido, uma vez que as células eliminadas não são substituídas por outras (*“end replication problem”*). Este fenómeno é um dos mecanismos que contribui para o envelhecimento e morte celular.

Como defesa para esse mecanismo, existe uma enzima, a telomerase,²⁹ descoberta por E. Blackburn e C. Greider em 1985, que tem como função adicionar sequências específicas e repetitivas de ADN à extremidade 3' dos cromossomas, impedindo o seu encurtamento. A telomerase é constituída por uma proteína (a TERT - “telomerase reverse transcriptase”) e por uma molécula de RNA (chamada TERC - “telomerase RNA component”). Esta enzima sintetiza ADN por complementaridade em relação à uma cadeia de RNA.

O TERC apresenta a sequência CAAUCCCAAUC, que funciona como molde para a telomerase sintetizar posteriormente o ADN necessário. Desta forma, segmentos de material genético perdidos durante a mitose podem ser substituídos (figura 70). Assim, a sequência TTAGGG ou T₂AG₃ é adicionada repetidamente à extremidade 3' da cadeia.

A actividade desta enzima é variável consoante o tipo de células:³⁰ em células germinativas, a actividade da telomerase é sempre elevada e portanto os seus telómeros não sofrem encurtamento e essas células não morrem; em células somáticas não cancerosas, que não estão directamente envolvidas na reprodução (por exemplo como as células epiteliais) a telomerase tem actividade baixa, o que promove o encurtamento dos telómeros e a morte celular. Em células neoplásicas, a telomerase tem um nível de actividade elevada, comportando-se estas como células germinativas e multiplicando-se de forma descontrolada.²⁹ Nos seres humanos, os telómeros são formados por repetição de 6 nucleotídeos obdecendo à sequência TTAGGG.

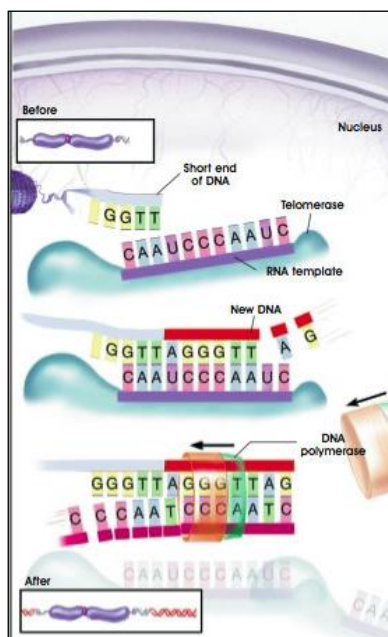


Figura 70 - Mecanismo de acção da telomerase³¹

Nas regiões ricas em guaninas (G) podem formar-se ligações de hidrogénio entre quatro guaninas de várias cadeias ou de partes da mesma cadeia, designadas por ligações de Hoogsteen.³²

Cada quarteto de guanina (figura 71) pode estabelecer interações π - π com tétradas adjacentes e formar arranjos empilhados. A coordenação dos oxigénios O6 dos grupos carbonilo das guaninas, a iões positivos, confere à estrutura uma estabilização adicional. Estes oxigénios estão direccionados para o centro, para catiões específicos localizados entre tétradas adjacentes.³²⁻³⁵

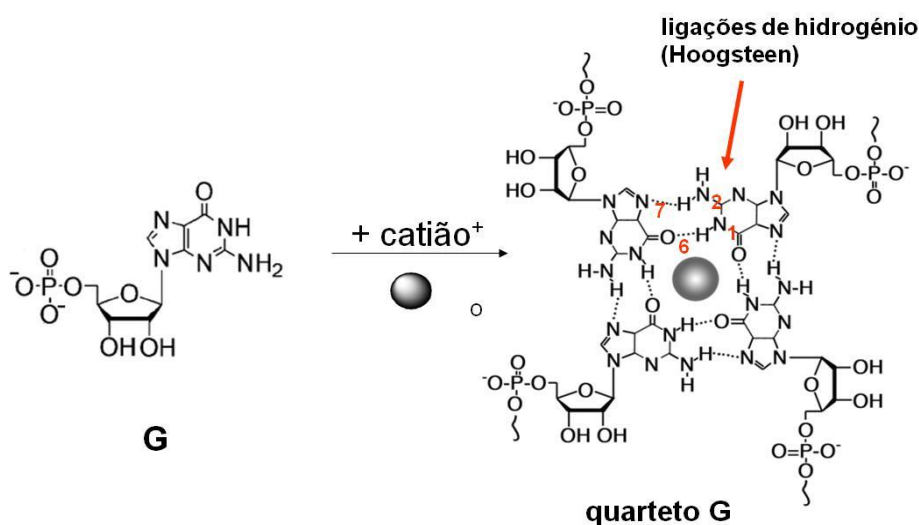


Figura 71 - Formação de um quarteto G em zonas ricas em guaninas (G)

O empilhamento destes quartetos de guanina, dá origem a estruturas designadas por G-quadruplexes. Estas estruturas encontram-se em regiões do genoma humano com elevada importância biológica, nomeadamente nos telómeros. O número de quartetos de guanina presentes na estrutura dos G-quadruplexes reflecte o número de guaninas presente na sequência que se repete (figura 72 A). A estabilidade da estrutura dos G-quadruplexes é garantida pela presença de catiões entre os vários quartetos, por exemplo K^+ , Na^+ e NH_4^+ , entre outros. O número de catiões estabilizadores presente corresponde a (n-1) relativamente ao número de quartetos (n), uma vez que cada catião se encontra localizado entre dois quartetos adjacentes.

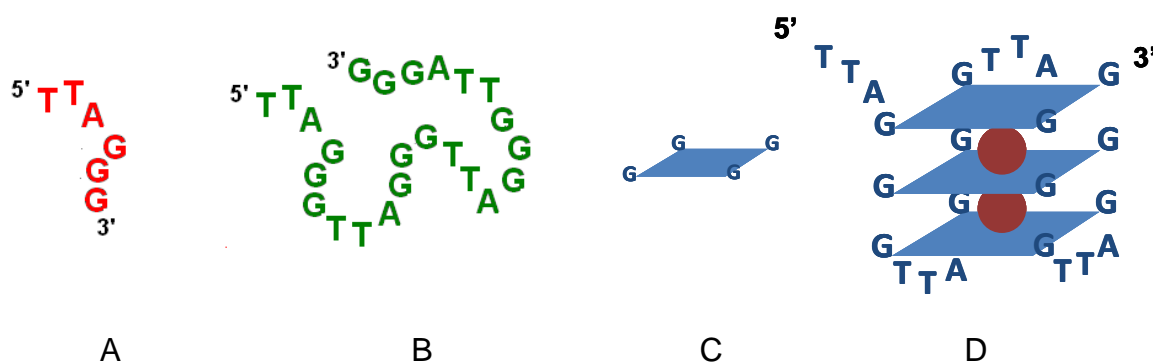


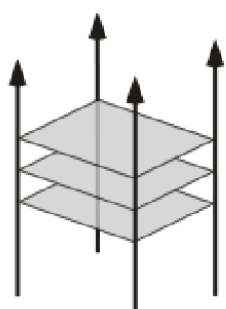
Figura 72 - Estrutura de um G-quadruplex intramolecular:

A - sequência base presente nos telómeros humanos; B - sequência presente nos telómeros humanos; C - tetradas de guaninas; D - empilhamento de três tetradas de guanina

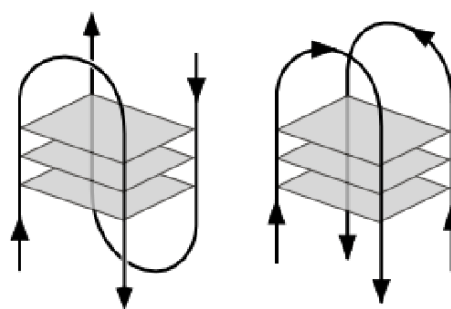
As estruturas dos G-quadruplexes variam em diferentes características-chave, incluindo estequiometria e orientação das cadeias, existência ou não de alças ou “*loops*”, e ângulos de torção glicosídicos. Com base no número de cadeias de ADN envolvidas na formação de um G-quadruplex, este pode ser intramolecular, quando envolve uma única cadeia, ou intermolecular quando envolve duas (bimolecular) ou quatro cadeias (tetramolecular) (figura 73). A formação de cada uma destas topologias está directamente relacionada com o tamanho da cadeia simples, uma vez que, para que haja a formação de “*loops*” (estruturas bi e unimoleculares) a cadeia tem que ter um número suficiente de

bases. Um G-quadruplex intramolecular envolve geralmente a presença de três “loops”. Nestes “loops”, que podem ser externos ou laterais³⁶, estão geralmente presentes outras bases da cadeia simples não envolvidas na formação dos quartetos de guanina, ou seja, que não são guaninas. Pensa-se que as estruturas de G-quadruplexes intramoleculares sejam biologicamente as mais relevantes, como por exemplo a cadeia $d(T_2AG_3)_4$ da cadeia telomérica humana.

Com base na orientação das cadeias, os G-quadruplexes intermoleculares podem ser classificados em três categorias: paralelos quando todas as cadeias se encontram no mesmo sentido, anti-paralelos quando duas cadeias se encontram numa direcção e as outras duas na direcção oposta, e mistos (paralelo / anti-paralelo), consoante a direcção em que se encontram as diferentes cadeias umas em relação às outras.

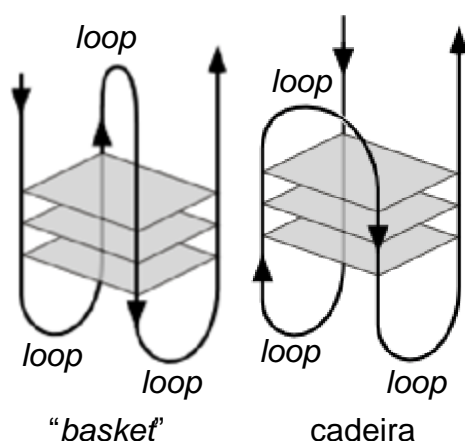


Tetramolecular (4 cadeias simples)



Bimolecular (2 cadeias simples)

Estruturas Intermoleculares



Estrutura Intramolecular (unimolecular, uma única cadeia)

Figura 73 - Topologias possíveis para os G-quadruplexes³⁷

A topologia mais simples de um G-quadruplex intermolecular é portanto aquela que envolve a auto-associação de quatro cadeias simples curtas de ADN contendo guaninas, como é exemplo a sequência TGGGGT ou TG₄T. As estruturas tetramoleculares desta sequência foram determinadas a partir das suas estruturas cristalinas (Raio-X de cristal único) e por RMN e estes estudos^{38,39} revelaram que o arranjo mais comum é aquele onde todas as cadeias estão paralelas.

No caso de oligonucleotídeos com 6 bases, como o d(TG₄T), foi postulada a necessidade da presença de, pelo menos, quatro guaninas consecutivas na cadeia simples, para a formação de quadruplexes tetramoleculares estáveis na sua forma canónica (figura 74 A).⁴⁰

Foi ainda proposta por outros autores⁴¹ a existência de estruturas tetramoleculares “*slipped*” (figura 74 B) nas quais uma das cadeias simples sofreu deslocamento (“deslizou”) formando uma estrutura de G-quadruplex contendo menos um quarteto de guanina e consequentemente, menos um catião estabilizador, relativamente ao que é observado nas estruturas dos G-quadruplexes ditas canónicas (figura 74 A).

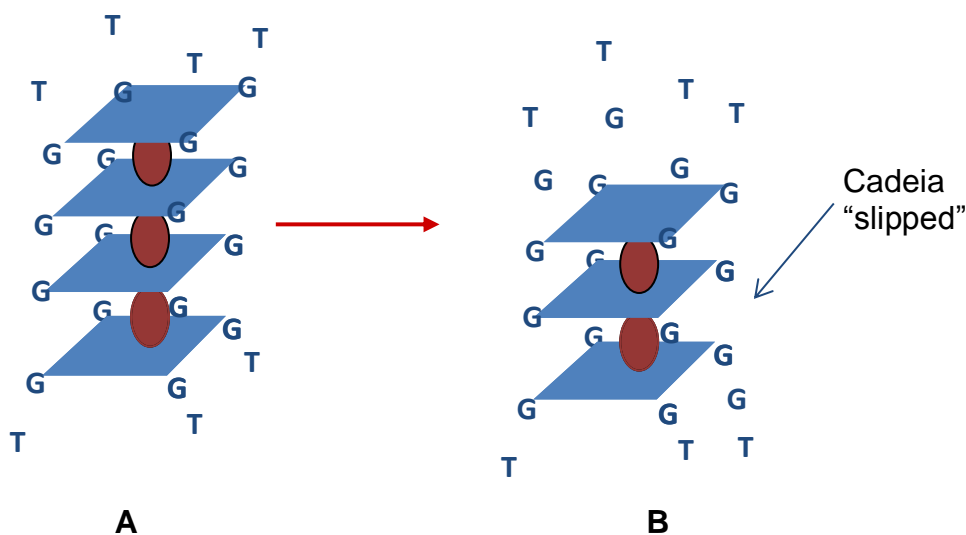


Figura 74 - Estrutura do G-quadruplex TGGGGT: A - forma canónica; B - forma “*slipped*”

Como foi anteriormente referido, a telomerase é expressa numa vasta gama de células cancerígenas^{42,43} e a estabilização das estruturas do G-quadruplex, situados na região terminal dos telómeros, foi descrita como relevante na inibição da actividade da telomerase.^{44,45} Este último facto desencadeou a investigação dos G-quadruplexes como alvos para a obtenção de novos fármacos.⁴⁶⁻⁵⁰

Bibliografia

¹ De Robertis E, De Robertis EM Jr. *Biologia Celular e Molecular*. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. **1996**. Cap. 2

² <http://www.dnareplication.info/dnadoublehelix.php> em (em 22-01-2012)

³ Campos LS. *Entender a Bioquímica*. Escolar editora 2ª ed revista. Lisboa. **1999**. Cap. 7 e 8

⁴ <http://dc220.4shared.com/doc/iCFQbOC7/preview.html> (em 22-01-2012)

⁵ Weil JH. *Bioquímica Geral*. Fundação Calouste Gulbenkian, 2ª ed. Lisboa. **2000**. Cap. 10

⁶ Leninger A. *Bioquímica*. Edgard Blücher. São Paulo. **1976**. Vol. 4

⁷ <http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=224> (em 22-01-2012)

⁸ Andy S, Toensing K, Eckel R, Wilking SD, Sewald N, Ros R, Anselmetti D. *Biophysical Journal*. **2005**; 88: 404

⁹ Drews J. *Science*. **2000**; 287: 1960

¹⁰ Graves De, Velea LM. *Current Organic Chemistry*. **2000**; 4: 915

¹¹ Li S, Cooper VR, Thonhauser T, Lundqvist BI, Langreth DC. *J. Phys. Chem. B*. **2009**; 113: 11166

¹² Strekowski L, Wilson B. *Mutat Res*. **2007**; 623(1-2):3

-
- ¹³ Xiong Y, Sundaralingam M. "Protein–Nucleic Acid Interaction: Major Groove Recognition Determinants". *Encyclopedia of Life Sciences*. **2001**
- ¹⁴ <http://xnet.rrc.mb.ca/davidb/dna.htm> (em 22-01-2012)
- ¹⁵ http://fbio.uh.cu/sites/genmol/adic/na_arch.htm (em 22-01-2012)
- ¹⁶ Blackburn EH. *Nature*. **1991**; 350: 569
- ¹⁷ <http://groups.mcr.umcutrecht.nl/timmers/student-projects/> (em 22-01-2012)
- ¹⁸ Blackburn EH. *Cell*. **1994**; 77: 621
- ¹⁹ Muller HJ. *Collecting Net* **1938**; 13(8): 182
- ²⁰ McClintock B. *Genetics*. **1941**; 26: 234
- ²¹ Bearss D, Hurley LH, Von Hoff DD. *Oncogene*. **2000**; 19: 6632
- ²² Watson JD. *Nat New Biol*. **1972**; 239(94): 197
- ²³ Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. *Journal of Molecular Biology*. **1992**; 225(4): 951
- ²⁴ Olovnikov AM. *Dokl Akad Nauk SSSR* **1971**; 201(6):1496
- ²⁵ Olovnikov AM. *J Theor Biol*. **1973**; 41(1): 181
- ²⁶ Shay JW, Wright WE. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2000**; 1(1):72
- ²⁷ Harley CB, Futcher AB, Greider CW. *Nature*. **1990**; 345: 458

- ²⁸ Hastie ND, Dempster M, Dunlap MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. *Nature*. **1990**; 346: 866
- ²⁹ Shay JW, Zou Y, Hiyama E, Wright WE. *Hum. Mol. Genet.* **2001**; 10(7): 677
- ³⁰ Shay JW, Bacchetti S. *Eur J Cancer*. **1997**; 33(5): 787
- ³¹ <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/appendixc.asp> (em 23-01-2012)
- ³² Davis JT, Spada GP. *Chem. Soc. Rev.* **2007**; 36: 296
- ³³ Williamson JR, Raghuraman MK, Cech TR. *Cell*. **1989**; 59: 871
- ³⁴ Sen D, Gilbert W. *Nature* **1988**; 334: 364
- ³⁵ Evans T, Schon E, Gora-Maslak G, Patterson J, Efstratiadis A. *Nucleic Acids Res.* **1984**; 12: 8043
- ³⁶ Neidle S, Balasubramian S. *Quadruplex Nucleic Acids*. RSC Publication. Cambridge. Reino Unido. **2006**; 1: 18
- ³⁷ <http://www.grin.com/en/doc/260488/dna-secondary-structures-in-the-promoters-of-human-vegf-and-ret-genes-and> (em 23-01-2012)
- ³⁸ Laughlan G, Murchie AI, Norman DG, Moore MH, Moody PC, Lilley DM, Luisi B. *Science*. **1994**; 265(5171): 520
- ³⁹ Phillips K, Dauter Z, Murchie AIH, Lilley DMJ, Luisi B. *J. Mol. Biol.* **1997**; 273(1): 171
- ⁴⁰ Zhou J, Yuan G, Liu J, Zhan C-G. *Chem. Eur. J.* **2007**; 13: 945

- ⁴¹ Rosu F, Gabelica V, Poncelet H, De Pauw E. *Nucleic Acids Res.* **2010**; 38: 5217
- ⁴² Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, Coviello GM, Wright WE, Weinrich RL, Shay J. *Science.* **1994**; 266: 2011
- ⁴³ Cech T. *Cell.* **2004**; 116: 27
- ⁴⁴ Zahler AM, Williamson JR, Cech TR, Prescott DM. *Nature.* **1991**; 350: 718
- ⁴⁵ Mergny JL, Mailliet P, Lavelle X, Riou JF, Laoui A, Helene C. *Anticancer Drug Des.* **1999**; 14: 327
- ⁴⁶ Hurley LH, Wheelhouse RT, Sun D, Kerwin SM, Salazar M, Fedoroff OY, Han FX, Izbicka E, Von Hoff DD. *Pharmacol. Ther.* **200**; 85: 14
- ⁴⁷ Oganesian L, Bryan TM. *Bioessays.* **2007**; 29: 155
- ⁴⁸ Read M, Harrison RJ, Romagnoli B, Tanious FA, Gowan SH, Reszka AP, Wilson WD, Kelland LR, Neidle S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**; 98: 4844
- ⁴⁹ Kerwin SM. *Curr. Pharm. Design.* **2000**; 6: 441 e referências neste inseridas
- ⁵⁰ Han H, Hurley LH. *TiPS.* **2000**; 21: 136 e referências neste inseridas

CAPÍTULO 5.

ESTUDO DAS INTERACÇÕES NÃO-COVALENTES DE QUADRUPLIXES E PORFIRINAS

5.1 - Estudo de interacções não-covalentes por espectrometria de massa

5.1.1 - Considerações gerais

Como é do conhecimento geral, da interacção dos átomos resulta muitas vezes a formação de moléculas (reacção química). A união dos átomos numa molécula é a bem conhecida ligação covalente, que teve a sua primeira descrição teórica, em 1916, por Lewis¹, ainda antes da teoria quântica da ligação química ter sido estabelecida. O estudo da ligação covalente constitui um dos fundamentos da Química Moderna. Este tipo de ligação implica a distribuição (deslocalização) de electrões entre dois (ou mais) átomos e em resultado disso a energia de ligação é elevada. No entanto, os átomos e as moléculas podem interagir de uma forma não reactiva, formando agregados moleculares, de tamanhos variados, sem que ocorra formação de ligações covalentes, sendo este tipo de interacção designado por não-covalente. Este tipo de interacção inclui todos os tipos das chamadas ligações de van der Waals,² embora o termo interacção de van der Waals seja muitas vezes usado para descrever um único tipo de interacção (forças de dispersão ou forças de London).

As interacções não-covalentes não suscitaram inicialmente o mesmo interesse que a ligação covalente e foi apenas nas últimas duas décadas do século passado que a sua importância na Natureza foi devidamente reconhecida. Actualmente o termo interacção não-covalente descreve um conjunto de ligações que incluem ligações de hidrogénio, interacções de empilhamento (“*stacking*”) em sistemas com electrões π e interacções electrostáticas, que incluem os vários tipos de ligações de van der Waals: dipolo permanente-dipolo permanente, dipolo permanente-dipolo induzido e dipolo instantâneo-dipolo induzido, as últimas também designadas por forças de London.

As chamadas interacções hidrófilas e hidrófobas, muito importantes em bioquímica são, na realidade ligações de van der Waals que ocorrem em soluções aquosas de substâncias orgânicas.

Na tabela 12 são apresentadas as energias de ligação para os principais tipos de ligação química.

Tabela 12 - Energias de ligação dos principais tipos de ligação química

Tipo de ligação química	Energia (kJ mol ⁻¹)
Ligações covalentes	200-500
Ligações iónicas	cerca de 20
Ligações de hidrogénio	12-29
Ligações de van der Waals	4-8

As interações não-covalentes são responsáveis pelas conformações tridimensionais adoptadas pelas biomoléculas e assumem um papel significativo na flexibilidade destas e nas suas interações com outras moléculas.

São vários os métodos usados na investigação das estruturas biomoleculares de ordem superior, sendo talvez as mais usadas a espectroscopia de ressonância magnética nuclear, o dicroísmo circular e a espectrometria de massa. A espectrometria de massa tem uma grande vantagem sobre os outros métodos uma vez que permite identificar e determinar as massas de moléculas e complexos.

A espectrometria de massa começou a ser usada no estudo de agregados não-covalentes com o aparecimento e desenvolvimento de técnicas de ionização “suaves” como o Electrospray e MALDI. A primeira aplicação da espectrometria de massa ao estudo de agregados não-covalentes foi feita por Ganem *et al*³ em 1991 usando Electrospray. A partir daí, as vantagens do uso da espectrometria de massa no estudo de complexos não-covalentes foram amplamente reconhecidas e dez anos mais tarde havia aproximadamente 300 publicações, das quais 20 artigos de revisão.⁴

Os requisitos fundamentais de uma técnica de ionização para análise de complexos não-covalentes, pré-formados em solução, são os seguintes:

- as espécies ionizadas devem ser transferidas intactas para a fase gasosa;
- a energia interna transferida para o complexo durante a ionização não deve causar a dissociação deste.

Os requisitos anteriores são obedecidos (em diferentes condições experimentais) pelas técnicas de Electrospray e de MALDI. Assim qualquer uma destas técnicas pode ser usada no estudo de interações não-covalentes nomeadamente com o ADN. No entanto, a técnica de MALDI deve ser reservada para complexos não-covalentes com energias de ligação mais elevadas.

5.1.2 - Interações não-covalentes de G-quadruplexes e porfirinas

A aplicação de ESI-MS ao estudo dos quadruplexes remonta a 1993, quando foi descrita⁵ a obtenção de espectros de massa de quadruplexes, a partir de soluções contendo catiões monoatômicos, tais como Li^+ , Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . No entanto, a generalização da ESI-MS como uma ferramenta útil para o estudo em fase gasosa de quadruplexes,⁶⁻¹¹ em especial para investigar as interações entre moléculas pequenas e G-quadruplexes,¹²⁻²² foi desencadeada por estudos^{23,24,25} nos quais foi descrita a formação de quadruplexes na presença de iões NH_4^+ .

A utilidade da espectrometria de massa, em geral, e, em particular, da ESI-MS, no estudo de interações intermoleculares envolvendo estruturas de ordem superior de ADN foi discutida em vários artigos de revisão^{26,27} com especial detalhe no caso dos G-quadruplexes.¹⁰ Além disso, estudos teóricos de dinâmica molecular confirmaram a eficiência do uso de ESI-MS para a descrição das estruturas de G-quadruplexes e a previsível utilidade desta técnica na análise dos aductos daquelas estruturas com potenciais inibidores da telomerase.²⁸

A 5,10,15,20-tetraquis(*N*-metilpiridinium-4-il)porfirina, porfirina **14**, uma porfirina catiónica que contém quatro cargas positivas, tem sido amplamente usada em estudos de interações não-covalentes com ADN, sendo reconhecida como estabilizadora de G-quadruplexes e portanto como inibidora potencial da telomerase humana.²⁹ A ligação desta e de outras porfirinas e outros porfirinóides

a estruturas de G-quadruplexes foi investigada por ESI-MS e por espectrometria de massa tandem.^{6,17,30}

Estudos de dissociação induzida por colisões do aducto da mesoporfirina IX, uma porfirina neutra, com o quadruplex intermolecular formado a partir de quatro cadeias da sequência d(TGGGGT) indicaram que a porfirina se ligava no exterior do quadruplex em vez de se empilhar entre as tétradas.⁶

A espectrometria de massa de mobilidade iónica foi também utilizada para estudar os aductos de outra porfirina neutra, a octaetilporfirina, e vários porfirinóides catiónicos com o quadruplex unimolecular d(TTAGGG)₄ que contém a sequência repetitiva da telomerase humana.¹⁷ Não foram encontrados quaisquer indícios de intercalação entre as tétradas ou de ligação externa específica tendo sido proposto o empilhamento externo como modo predominante de ligação para todos os compostos, excepto para o derivado etílico do ciclo[8]pirrol.¹⁷ A estabilização adicional de vários quadruplexes unimoleculares, através da formação de aductos com diversos ligandos, incluindo a 5,10,15,20-*tetraquis*(N-metilpiridinium-4-il)porfirina, porfirina **14**, foi também detectada por espectrometria de massa de mobilidade iónica e o modo de ligação por empilhamento nos extremos foi proposto como o predominante.³⁰

Em estudos anteriores desenvolvidos por nós,^{31,32} usámos ESI-MS e ESI-MS/MS para investigar os aductos de oligonucleotídeos de cadeia dupla, com as porfirinas catiónicas **1**, **4**, **9** e **14**, tendo-se concluído que a força de ligação aumentava com o número de cargas positivas das porfirinas. Um tratamento semelhante poderia ser aplicado aos aductos de quadruplexes com a porfirina **14** e outras *N*-alquilpiridilporfirinas, com a finalidade de estudar os processos complexos da formação daquelas espécies, e, em última instância, prever a capacidade de inibição da telomerase por porfirinas catiónicas, uma vez que a presença de cargas positivas em potenciais fármacos anti-cancerígenos foi descrita como um factor importante no processo de inibição da telomerase.³³

Para oligonucleotídeos como d(TGGGGT) ou d(TG₄T) e d(TTGGGGGT) ou d(T₂G₅T) a formação de quadruplexes tetramoleculares na sua forma canónica, contendo quatro cadeias paralelas, é o processo mais frequente.¹⁰ Aquelas espécies, como por exemplo $[d(TG_4T)_4 + 3NH_4^+ - (3+z)H^+]^{z-}$ e

$[d(T_2G_5T)_4 + 4NH_4^+ - (4+z)H^+]^{z-}$, são estabilizados pelos cátions NH_4^+ localizados entre os quartetos de guaninas, cujo número é inferior em uma unidade ao número dos ditos quartetos. No entanto, estruturas “slipped” que, como já foi referido anteriormente, contêm menos um quarteto de guaninas e em que o número dos iões NH_4^+ , também diminui de uma unidade em relação às formas canónicas, como por exemplo os iões $[d(TG_4T)_4 + 2NH_4^+ - (2+z)H^+]^{z-}$ e $[d(T_2G_5T)_4 + 3NH_4^+ - (3+z)H^+]^{z-}$ foram também identificadas.¹¹

5.2 - Estudo das interacções não-covalentes de G-quadruplexes e porfirinas por espectrometria de massa

O objectivo do presente trabalho foi comparar os efeitos das cargas e substituintes de um grupo de 17 porfirinas na estrutura e estabilidade dos aductos de quadruplexes tetramoleculares, formados a partir das cadeias simples d(TG₄T) e d(T₂G₅T).

Numa primeira parte, foi estudado o comportamento dos aductos de um conjunto de nove porfirinas, uma neutra e oito catiónicas, e dos quadruplexes formados a partir dos dois oligonucleotídeos seleccionados. Foram comparados os efeitos da presença de substituintes diferentes para porfirinas com o mesmo número de cargas e do diferente número de cargas para porfirinas com o mesmo tipo de substituintes.

Numa segunda parte, foi estudado o comportamento dos aductos de um outro grupo de oito porfirinas catiónicas e dos mesmos quadruplexes formados a partir das cadeias simples d(TG₄T) e d(T₂G₅T). Foram comparados os efeitos da presença e número de átomos electroatractores (F) nos grupos substituintes não carregados, para porfirinas com o mesmo número de cargas. No caso de porfirinas com duas cargas positivas, foi investigada a diferença de comportamento dos aductos de dois pares de isómeros geométricos.

Numa fase prévia foram feitas diversas experiências, envolvendo a variação de diversos parâmetros experimentais: preparação da estrutura do G-quadruplex, estequiometria G-quadruplex-porfirina e tempos de interacção. Foram também optimizados parâmetros instrumentais, tais como temperaturas de dessolvatação e da fonte, voltagem do cone e agulha e fluxo de introdução da amostra. Todas estas experiências são descritas em pormenor no sub-capítulo 5.4.

Tendo como base as condições optimizadas procedeu-se então ao estudo, por espectrometria de massa com ionização por Electrospray (ESI e ESI-MS/MS) das interacções não-covalentes dos G-quadruplexes seleccionados com cada uma das diferentes porfirinas. As soluções dos diferentes quadruplexes foram preparadas em solução tampão de acetato de amónio de forma a garantir o pH

fisiológico. A estas soluções foram então adicionadas soluções das porfirinas, dissolvidas em metanol. Este solvente foi descrito como sendo um solvente muito favorável para a formação de estruturas de G-quadruplexes.^{11,34}

Por uma questão de simplicidade passaremos a designar os quadruplexes d(TG₄T)₄ e d(T₂G₅T)₄ por Q1 e Q2, respectivamente.

Para todas as porfirinas e quadruplexes estudados serão usadas as fórmulas gerais



onde z é a carga global do sinal observado, p a carga da porfirina e n o número de iões amónio presentes que, como foi anteriormente referido, está directamente relacionado com o número de guaninas presente na cadeia simples. Q representa a estrutura do G-quadruplex e P a porfirina.

As tabelas utilizadas para previsão dos possíveis aductos para os diferentes quadruplexes encontram-se nos anexos 3 a 6.

5.2A - Estudo dos aductos das porfirinas 1, 4, 9, 14 a 18 e 19 e dos quadruplexes Q1 e Q2

O estudo de interacção entre um grupo de porfirinas, uma neutra e oito atiónicas (figura 75) e os dois quadruplexes tetramoleculares Q1 e Q2 foi efectuado, por ESI-MS e ESI-MS/MS. As porfirinas diferem entre si no número de cargas, 0 a 4, e no tamanho da cadeia alifática presente nos grupos substituintes (grupos metilo, etilo, pentilo e dodecilo, no caso das *N*-alquiperidilporfirinas). Foi também escolhida uma porfirina com grupos substituintes susceptíveis de causar maior impedimento estereoquímico, porfirina 18. Na figura seguinte são apresentadas as estruturas das porfirinas estudadas nesta parte do trabalho.

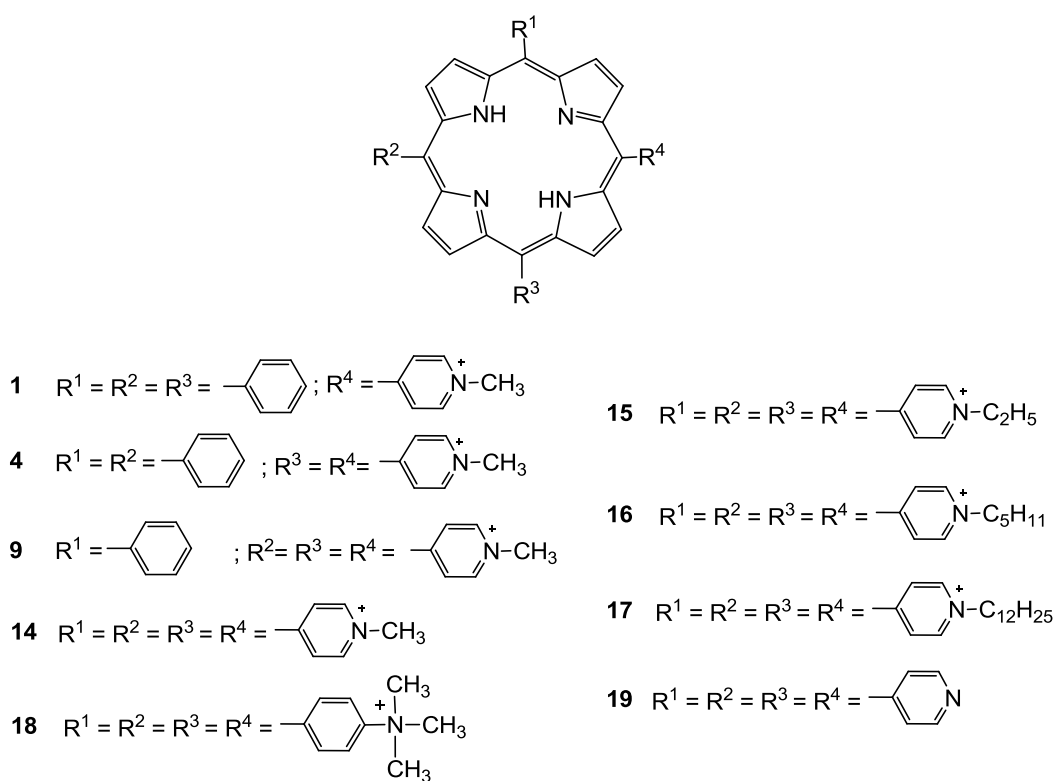


Figura 75 - Porfirinas estudadas

5.2A.1 - Espectros de massa

Os espectros de massa das soluções dos quadruplexes mostraram sinais correspondentes às estruturas canônicas dos quadruplexes contendo três e quatro cátions NH_4^+ , $[\text{Q1}+3\text{NH}_4^+-7\text{H}^+]^{4-}$, $[\text{Q1}+3\text{NH}_4^+-8\text{H}^+]^{5-}$, $[\text{Q2}+4\text{NH}_4^+-9\text{H}^+]^{5-}$ e $[\text{Q2}+4\text{NH}_4^+-10\text{H}^+]^{6-}$ onde $\text{Q1}=[\text{d}(\text{TG}_4\text{T})]_4$ e $\text{Q2}=[\text{d}(\text{T}_2\text{G}_5\text{T})]_4$. Foram também observados os iões correspondentes às cadeias simples $[\text{d}(\text{TG}_4\text{T})-\text{zH}^+]^{z-}$ e $[\text{d}(\text{T}_2\text{G}_5\text{T})-\text{zH}^+]^{z-}$ ($z=2$ e 3). A figura seguinte mostra os espectros de massa obtidos para as soluções contendo apenas os quadruplexes.

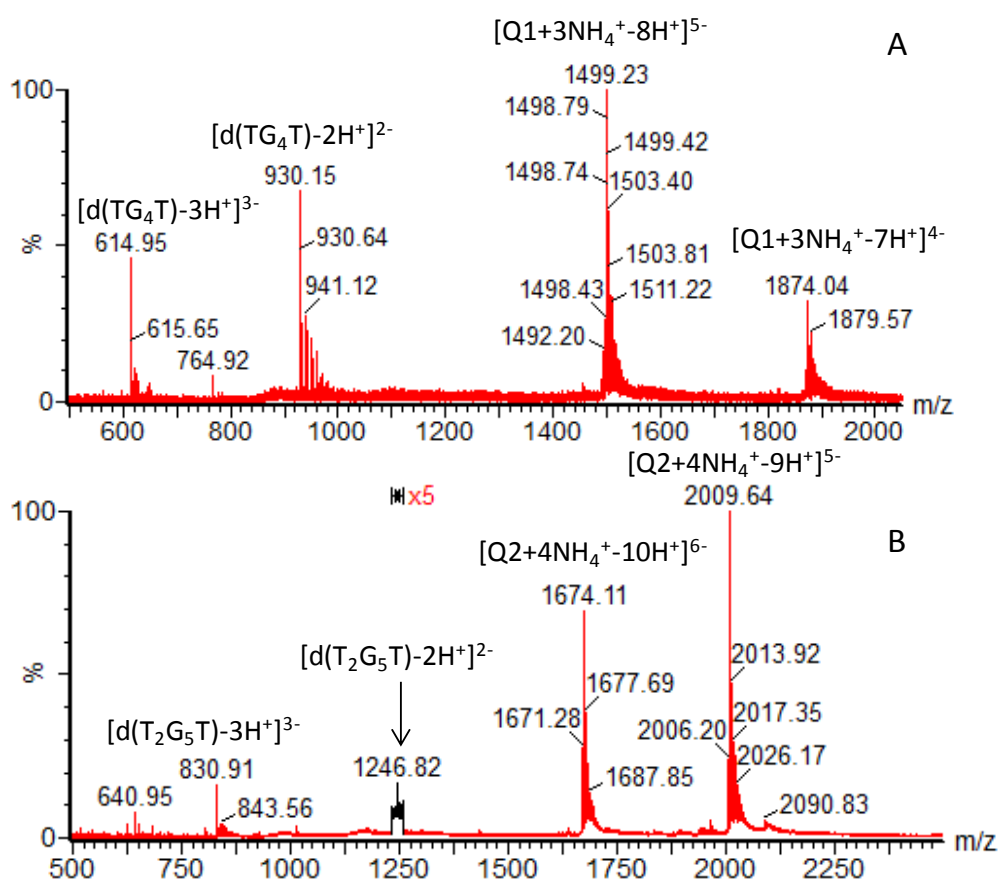


Figura 76 - Espectros de massa obtidos para os quadruplexes: A - Q1; B - Q2

Como se pode verificar a intensidade relativa obtida para os diferentes sinais identificados, varia com os quadruplexes.

Nos espectros de massa das soluções mistas oligonucleotídeo-porfirina detectaram-se, além dos iões acima mencionados, aductos quadruplex-porfirina com carga negativa variável entre 4 e 6, nomeadamente, $[\text{Q1}+3\text{NH}_4^++\text{P}^{p-}]^{p-}$.

$(7+p)H^+)^{4-}$, $[Q1+3NH_4^++P^{p+}-(8+p)H^+]^{5-}$, $[Q2+4NH_4^++P^{p+}-(9+p)H^+]^{5-}$ e $[Q2+4NH_4^++P^{p+}-(10+p)H^+]^{6-}$ ($p = 0$ a 4), sendo a sua abundância relativa variável com o oligonucleotídeo e com a porfiringa.

Não foi possível observar iões-aducto com carga global mais baixa, uma vez que as suas razões massa/carga (m/z) saíam fora dos limites de massa instrumentais.

Na figura 77 são apresentados os espectros de massa obtidos, nas mesmas condições experimentais, para a solução contendo o quadruplex Q1 e para a solução mista do mesmo quadruplex com a porfiringa 9. É possível identificar nestes espectros, para além do sinal correspondente à cadeia simples $[d(TG_4T)-2H^+]^{2-}$, os sinais das estruturas do quadruplex, com fórmula geral $[Q1+3NH_4^+-(3+z)H^+]^{z-}$, bem como os sinais dos seus aductos com a porfiringa, com fórmula geral $[Q1+3NH_4^++P^{3+}-(6+z)H^+]^{z-}$ ($z=4$ e 5).

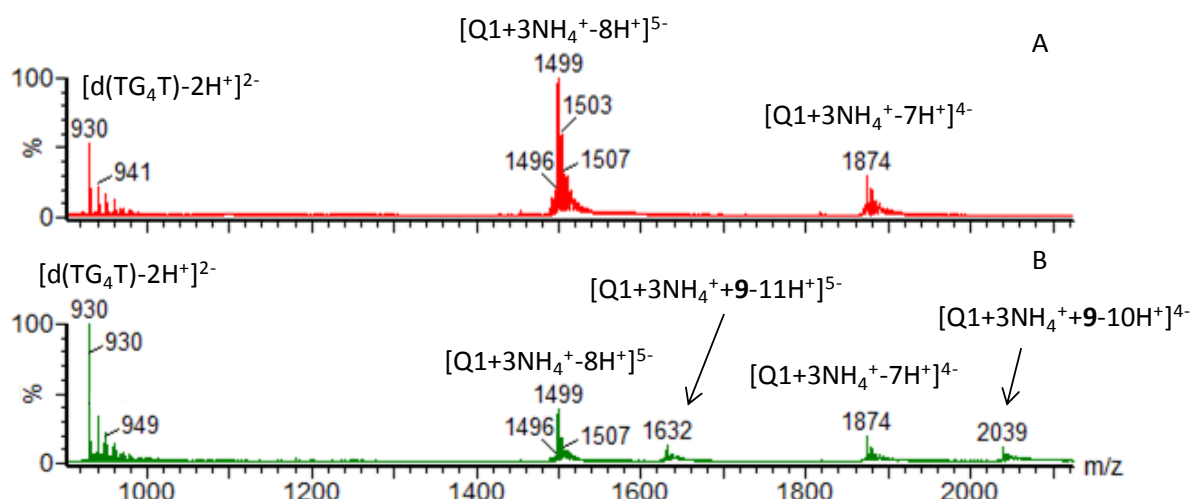


Figura 77 - Espectros de massa obtidos para A - solução do quadruplex Q1 (TG_4T); B - solução mista de Q1 e da porfiringa 9

Para as estruturas dos quadruplexes, com fórmula geral $[Q+nNH_4^+-(z+n)H^+]^{z-}$, a carga negativa é o resultado da desprotonação com formação de iões fosfato. Diferentes locais de desprotonação poderiam traduzir-se em estruturas de quadruplexes com diferentes estabilidades. No entanto, representações das estruturas correspondentes a diferentes locais de desprotonação podem ser obtidas a partir das suas secções eficazes de reacção por estudos de dinâmica molecular. Estudos do tipo referido indicaram não haver

diferenças significativas nas secções eficazes teóricas observadas para diferentes locais de desprotonação da estrutura pentose-fosfato,^{28,30,35} pelo que é geralmente assumido que as estruturas formadas pela perda do mesmo número de prótons, têm estabilidades muito semelhantes.

Para os aductos com fórmula geral $[Q+nNH_4^++P^{p+}-(z+n+p)H^+]^{z-}$, a carga negativa global é o resultado do balanço entre as cargas negativas devidas à desprotonação e as cargas positivas dos iões amónio e das porfirinas presentes na estrutura final.

5.2A.2 - Espectros de iões-produto

Aductos com menor carga negativa global - $[Q1+3NH_4^++P^{p+}-(7+p)H^+]^{4-}$, e $[Q2+4NH_4^++P^{p+}-(9+p)H^+]^{5-}$ ($p=0$ a 4)

Para todos os quadruplexes estudados, verificou-se que os aductos com menor número de cargas negativas, -4 para Q1 e -5 para Q2, se fragmentam, sem separação de cadeias, mantendo-se a estrutura do quadruplex como um todo.

Os espectros de iões-produto dos aductos com as porfirinas contendo quatro cargas positivas (porfirinas **14** a **18**), $[Q1+3NH_4^++P^{4+}-11H^+]^{4-}$ e $[Q2+4NH_4^++P^{4+}-13H^+]^{5-}$, são muito semelhantes e os iões-fragmento mais abundantes resultam de perdas de três e quatro moléculas de NH_3 , respectivamente. As estruturas anteriores que não contêm iões NH_4^+ no seu interior, com fórmula geral $[Q+P^{p+}-(z+p)H^+]^{z-}$, passarão a ser designadas por estruturas “unfilled”.

Nos espectros de iões-produto das porfirinas com duas e três cargas positivas, porfirinas **4** e **9** respectivamente, o processo de fragmentação dominante ocorre igualmente por perdas de moléculas de NH_3 com formação de estruturas “unfilled”, $[Q1+P^{p+}-(4+p)H^+]^{4-}$ e $[Q2+P^{p+}-(5+p)H^+]^{5-}$ ($p=2$ ou 3).

No caso dos aductos da porfirimina contendo apenas uma carga positiva, porfirimina **1**, os iões-fragmento mais abundantes resultam da perda da porfirimina

com formação das espécies $[Q1+3NH_4^+-7H^+]^{4-}$ e $[Q2+4NH_4^+-9H^+]^{5-}$. A formação, por perda de moléculas de NH_3 , de espécies “unfilled” $[Q1+P^+-5H^+]^{4-}$ e $[Q2+P^+-6H^+]^{5-}$ é também observada, no entanto a abundância relativa destes iões-fragmento é baixa. Para a porfirina neutra estudada, porfirina **19**, o processo de fragmentação dominante resulta igualmente da eliminação da porfirina com formação dos iões $[Q1+3NH_4^+-7H^+]^{4-}$ e $[Q2+4NH_4^+-9H^+]^{5-}$.

Os comportamentos descritos podem ser observado na figura **78** onde são apresentados, como exemplo, os espectros de iões-produto dos quadruplexes Q1 com as porfirinas **1**, **14** e **18** ($p=1$ e 4), obtidos nas mesmas condições experimentais.

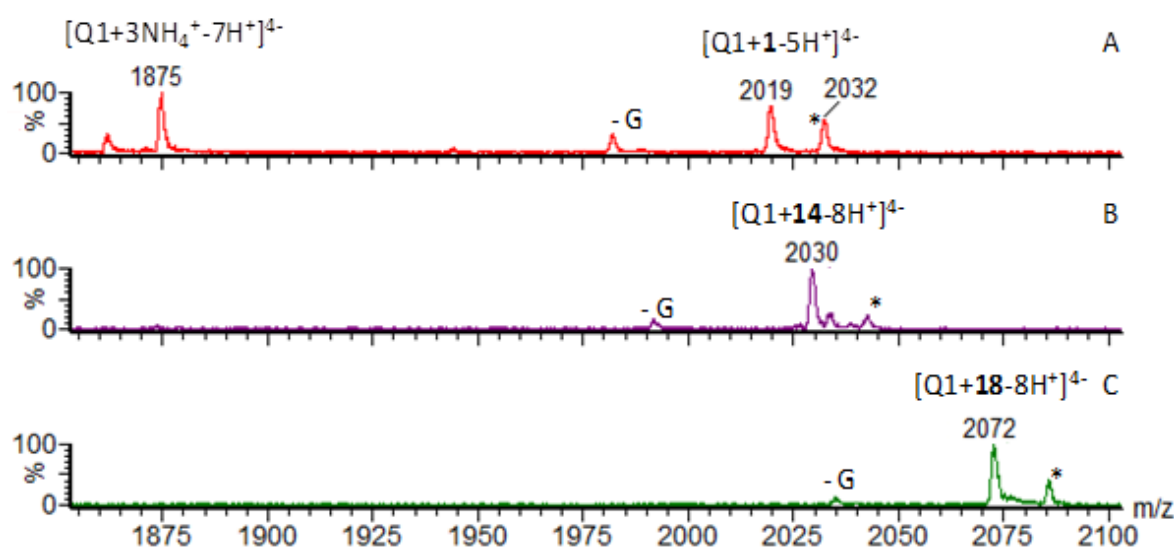


Figura 78 - Espectros de iões-produto dos aductos $[Q1+3NH_4^++P^{p+}-(7+p)H^+]^{4-}$ (identificados por *) com: A - porfirina **1**; B - porfirina **14**; C - porfirina **18**

As tendências anteriores podem também ser observadas na figura **79** onde são apresentados os iões-produto $[Q1+3NH_4^+-7H^+]^{4-}$ e $[Q1+P^{p+}-(4+p)H^+]^{4-}$ obtidos a partir do precursor $[Q1+3NH_4^++P^{p+}-(7+p)H^+]^{4-}$, e os iões-produto $[Q2+4NH_4^+-9H^+]^{5-}$ e $[Q2+P^{p+}-(5+p)H^+]^{5-}$ obtidos a partir do precursor $[Q2+4NH_4^++P^{p+}-(9+p)H^+]^{5-}$, para as porfirinas **1**, **4**, **9**, **14** e **19**, ($p=0$ a 4) para o mesmo valor de energia de colisão (30 eV). As abundâncias foram normalizadas relativamente ao somatório de todos os iões-fragmento e precursor.

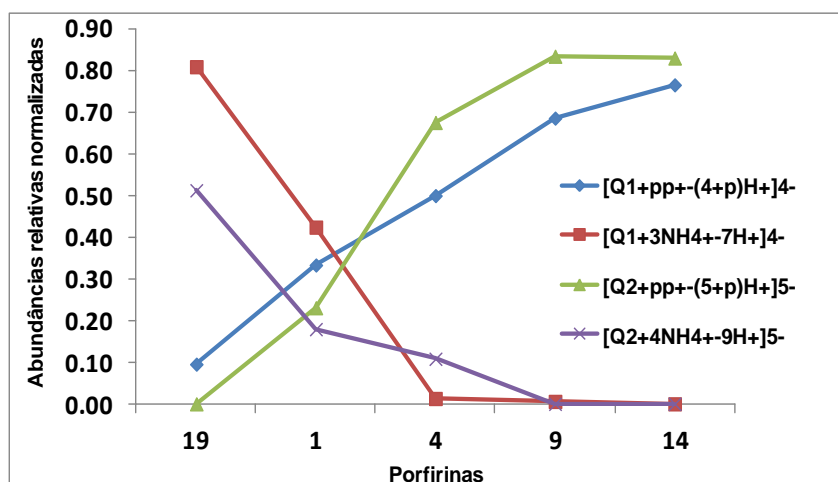


Figura 79 - Abundâncias relativas dos íões-produto do espectro de íões-produto obtido a partir dos íões precursores $[Q+nNH_4^{+}+P^{p+}-(z+n+p)H^{+}]^{z-}$ para as porfirinas 19, 1, 4, 9 e 14

Para comparação da estabilidade relativa dos complexos com porfirinas contendo diferente número de cargas, as abundâncias normalizadas para o íão-precursor $[Q2+4NH_4^{+}+P^{p+}-(9+p)H^{+}]^{5-}$ e os íões-fragmento, a uma energia de colisões de 30 eV, são apresentadas na figura 80.

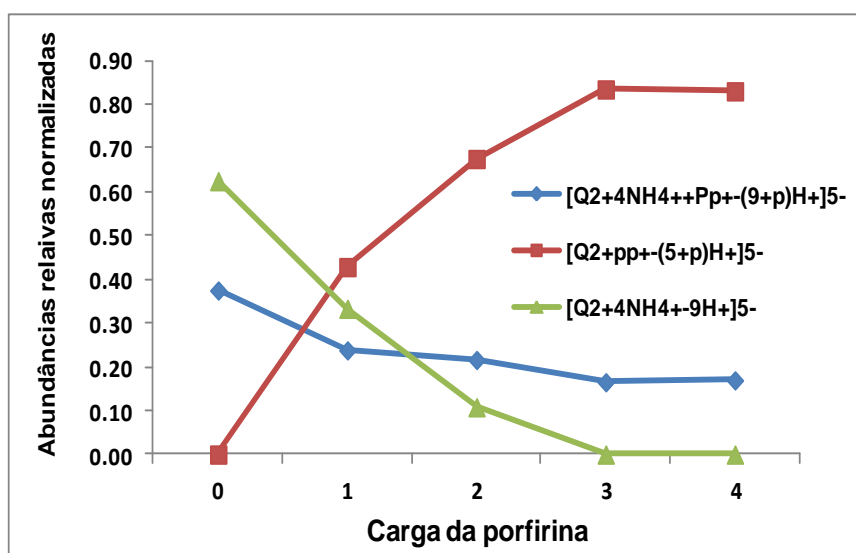


Figura 80 - Abundâncias relativas normalizadas dos íões-produto e precursor obtidos no espectro de íões-produto dos íões precursores $[Q2+4NH_4^{+}+P^{p+}-(9+p)H^{+}]^{5-}$, $p = 0$ a 4, para as porfirinas 19, 1, 4, 9 e 14

Pela análise do gráfico anterior, verifica-se que, para os complexos $[Q+nNH_4^++P^{p+}-(z+n+p)H^+]^{z-}$, a fragmentação por perdas de NH_3 com a formação das espécies "unfilled" $[Q+P^{p+}-(z+p)H^+]^{z-}$ aumenta com o número de cargas e é dominante para as porfirinas com dois, três e quatro cargas positivas. A perda de porfirina com a formação dos quadruplexes $[Q+nNH_4^++(z+n)H^+]^{z-}$ só é significativa para a porfirina neutra, porfirina **19**, e para a porfirina com uma carga positiva, porfirina **1**. Devemos recordar que estas porfirinas são semelhantes no que diz respeito ao impedimento estereoquímico causado pelos grupos substituintes periféricos.

Para porfirinas com o mesmo número de cargas (quatro cargas positivas) e substituintes periféricos diferentes, porfirinas **14** a **18**, a fragmentação dos aductos não se altera significativamente, em termos do tipo e da abundância dos iões-fragmento formados. As espécies "unfilled" $[Q+P^{4+}-(8+z)H^+]^{z-}$ são mais abundantes para a porfirina **14** (substituintes metilpiridilo) e as menos abundantes são observadas para a porfirina **17** (substituintes dodecylpiridilo). É interessante notar que não há diferenças significativas nas abundâncias relativas destas espécies para a porfirina **18** (substituintes com maior impedimento estereoquímico).

Estas tendências podem ser observadas na figura **81** onde são apresentadas as abundâncias normalizadas dos iões-produto, $[Q1+3NH_4^+-7H^+]^{4-}$ e $[Q1+P^{4+}-8H^+]^{4-}$ do ião precursor $[Q1+3NH_4^++P^{4+}-11H^+]^{4-}$ e os iões-produto $[Q2+4NH_4^+-9H^+]^{5-}$ e $[Q2+P^{4+}-9H^+]^{5-}$ do precursor $[Q2+4NH_4^++P^{4+}-13H^+]^{5-}$, com as porfirinas **14** a **18** ($p=4$), para o mesmo valor de energia de colisão (27 eV). As abundâncias foram normalizadas, para todos os aductos, relativamente ao somatório de todos os iões-fragmento e precursor.

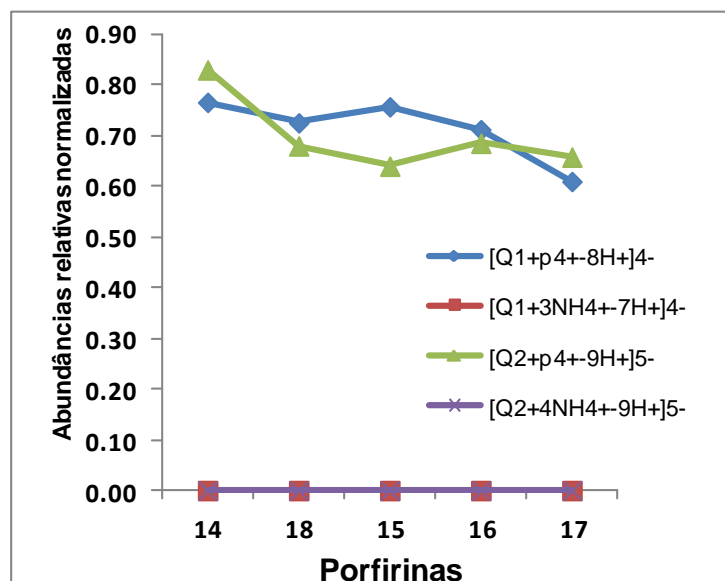


Figura 81 - Abundâncias relativas do espectro de íões-produto obtido a partir dos íões precursores $[Q+nNH_4^++P^{4+}-(z+n+4)H^+]^{z-}$ ($z=4$ para Q1 $z=5$ para Q2) com as porfirinas **14** a **18**

Aductos com maior carga negativa global - $[Q1+3NH_4^++P^{p+}-(8+p)H^+]^{5-}$ e $[Q2+4NH_4^++P^{p+}-(10+p)H^+]^{6-}$ ($p=0$ a 4)

Os espectros de íões-produto dos aductos com maior carga negativa global, -5 para Q1 e -6 para Q2, são diferentes dos correspondentes espectros dos aductos com menor carga global e a sua fragmentação envolve separação de cadeias.

Os complexos formados para as porfirinas **14** a **18** (quatro cargas positivas), fragmentam-se principalmente por perda de três e quatro moléculas de NH_3 dando origem às espécies “unfilled” $[Q1+P^{4+}-9H^+]^{5-}$ e $[Q2+P^{4+}-10H^+]^{6-}$, respectivamente. É também observada separação de cadeias com formação dos pares $[d(TG_4T)]_3+P^{4+}-7H^+]^{3-}$ / $[d(TG_4T)-2H^+]^{2-}$ para Q1 e $[d(T_2G_5T)]_3+P^{4+}-8H^+]^{4-}$ / $[d(T_2G_5T)-2H^+]^{2-}$ para Q2. Por uma questão de simplicidade vai passar a usar-se a notação T1 para $[d(TG_4T)]_3$ e T2 para $[d(T_2G_5T)]_3$ e SS1 para Q1 e SS2 para Q2. Este comportamento pode ser observado nas figuras **82** e **83** onde são apresentados os espectros de íões-produto das porfirinas **15** e **16** com o quadruplex Q2 e das porfirinas **14** a **18** com o quadruplex Q1, respectivamente, obtidos nas mesmas condições experimentais.

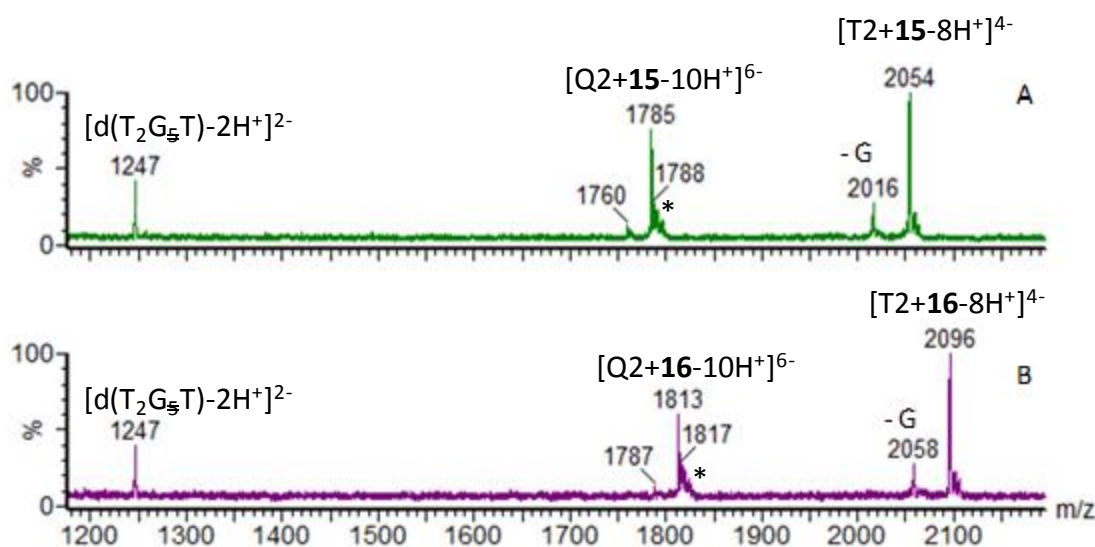


Figura 82 - Espectros de íões-produto dos aductos $[Q2+4NH_4^++P^{4+}-14H^+]^{6-}$ (identificado por *) com: A - porfirina **15**; B - porfirina **16**

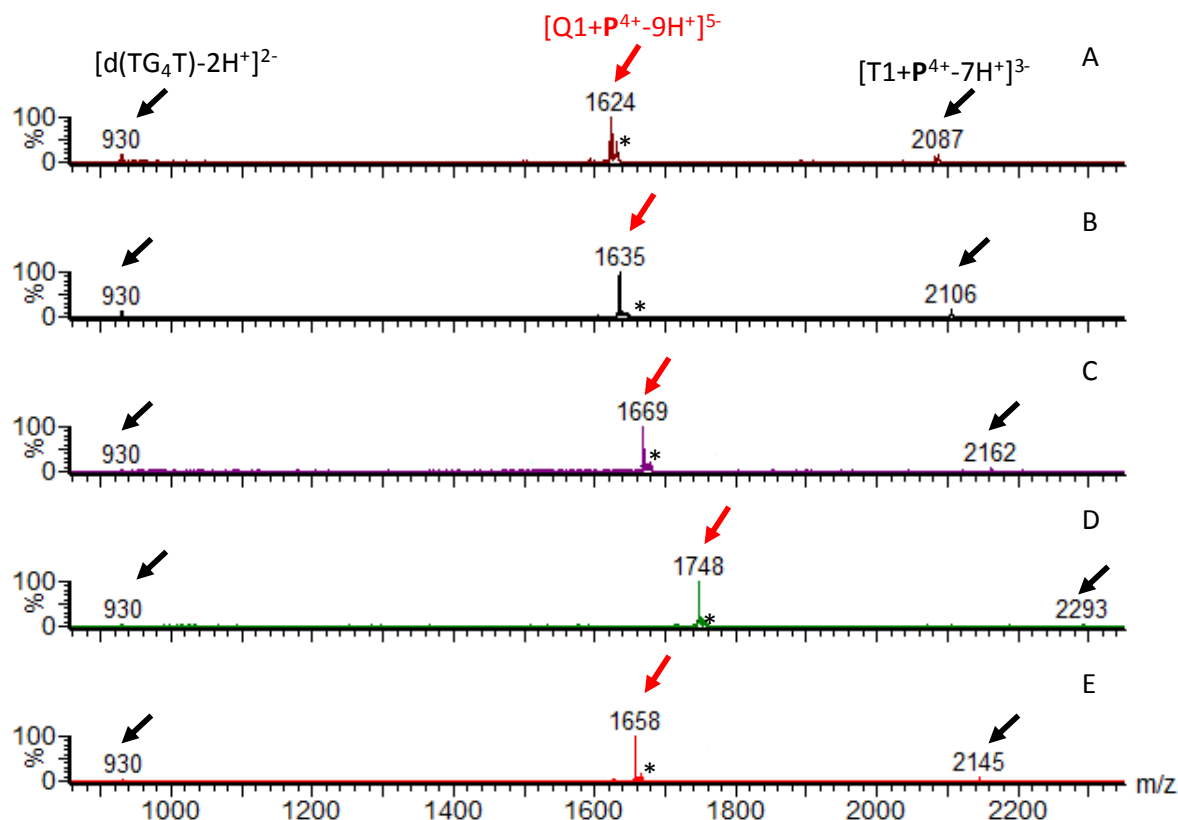


Figura 83 - Espectros de íons-produto obtidos para o aduto $[Q1+3NH_4^++P^{4+}-12H^+]^{5-}$ (íons precursores *) com: A - porfirina **14**; B - porfirina **15**; C - porfirina **16**; D - porfirina **17** e E - porfirina **18**

No caso da porfirina **9** (três cargas positivas), a principal via de fragmentação resulta da separação de cadeias, com formação dos pares, $[T1+P^{3+}-6H^+]^{3-}$ / $[d(TG_4T)-2H^+]^{2-}$ para Q1 e $[T2+P^{3+}-7H^+]^{4-}$ / $[d(T_2G_5T)-2H^+]^{2-}$ para Q2. São também observadas as espécies “unfilled” $[Q1+P^{3+}-8H^+]^{5-}$ e $[Q2+P^{3+}-9H^+]^{6-}$, resultantes da perda de moléculas de NH_3 . Este comportamento é ilustrado na figura seguinte onde podem ser observados os espectros de íons-produto dos adutos $[Q1+3NH_4^++9-11H^+]^{5-}$ e $[Q2+4NH_4^++9-13H^+]^{6-}$ correspondentes às soluções mistas de Q1 e Q2, respectivamente, com a porfirina **9**.

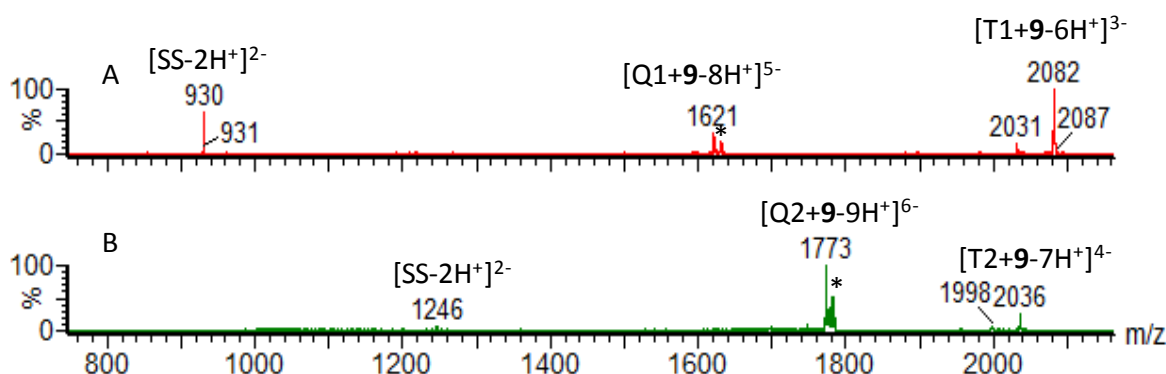


Figura 84 - Espectros de íões-produto dos aductos (identificado por *):

A - $[Q1+3NH_4^++9-11H^+]^{5-}$; B - $[Q2+4NH_4^++9-13H^+]^{6-}$

Para os complexos com a porfirina **4** (duas cargas positivas), o processo de fragmentação dominante resulta da separação de cadeias, com formação dos pares, $[T1+P^{p+}-(3+p)H^+]^{3-}$ / $[d(TG_4T)-2H^+]^{2-}$ para Q1 e $[T2+P^{p+}-(4+p)H^+]^{4-}$ / $[d(T_2G_5T)-2H^+]^{2-}$ para Q2, embora a perda de porfirina com formação das espécies $[Q1+3NH_4^+-8H^+]^{5-}$ e $[Q2+4NH_4^+-10H^+]^{6-}$ seja também observada. Para a porfirina **1** (uma positiva) o processo de fragmentação dominante é a perda de porfirina com formação das espécies $[Q1+3NH_4^+-8H^+]^{5-}$ e $[Q2+4NH_4^+-10H^+]^{6-}$ embora também seja observada separação de cadeias.

Para os aductos da porfirina neutra, porfirina **19**, a perda de porfirina, com formação dos íões-fragmento $[Q1+3NH_4^+-8H^+]^{5-}$ e $[Q2+4NH_4^+-10H^+]^{6-}$ é o processo de fragmentação dominante, embora ocorra também separação de cadeias. O anião porfirínico $[P-H]^-$ é também observado, embora com baixa abundância relativa.

O comportamento anterior é ilustrado na figura **85** onde se apresentam os espectros de íões-produto dos aductos $[Q1+3NH_4^++P^{p+}-(8+p)H^+]^5$ do quadruplex Q1 com a porfirina neutra, porfirina **19**, e com a porfirina **4** (duas cargas positivas), obtidos nas mesmas condições experimentais.

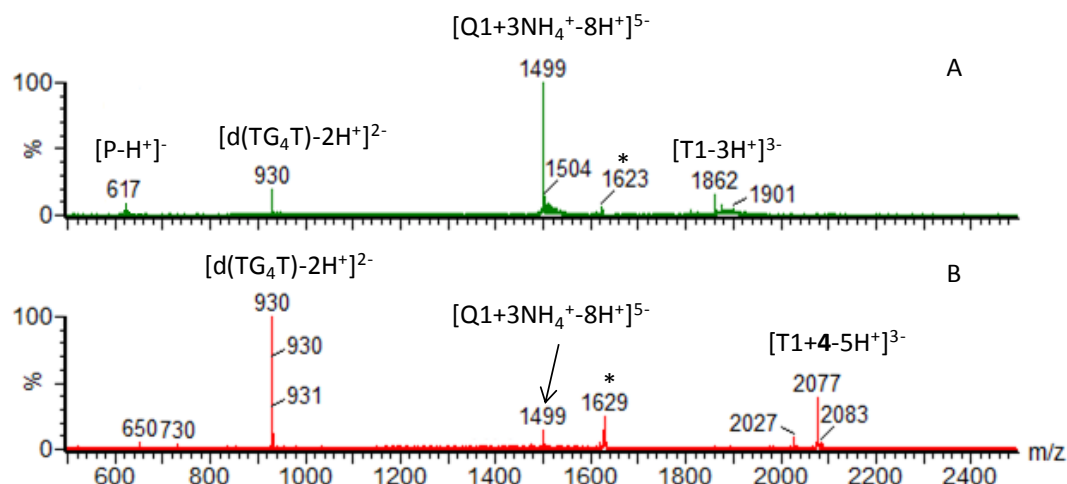


Figura 85 - Espectros de íões-produto dos aductos [Q1+3NH₄⁺+P^{p+}-(8+p)H⁺]⁵⁻ (identificado por *) com: A - porfirina **19**; B - porfirina **4**

A comparação do comportamento destes aductos com o aumento do número de cargas das porfirinas irá ser descrita a seguir. Para a porfirina neutra e para a porfirina com uma carga positiva a perda de porfirina é predominante sobre a separação de cadeias. O processo de separação de cadeias com formação dos íões [T+P^{p+}-(z-2+p)H⁺]^{(z-2)-} predomina para as porfirinas com duas e três cargas positivas. Para as porfirinas com quatro cargas positivas o processo dominante é a formação de espécies "unfilled" [Q+P^{p+}-(z+p)H⁺]^{z-}.

Este comportamento é ilustrado na figura **86** onde são apresentadas as abundâncias relativas normalizadas dos íões-produto [Q1+P^{p+}-(5+p)H⁺]⁵⁻, [Q1+3NH₄⁺+8H⁺]⁵⁻, [T1+P^{p+}-(3+p)H⁺]³⁻ e [SS1-2H⁺]²⁻ do precursor [Q1+3NH₄⁺+P^{p+}-(8+p)H⁺]⁵⁻ com as porfirinas **1**, **4**, **9**, **14** e **19** (p= 0 a 4) para o mesmo valor de energia de colisão (20 eV).

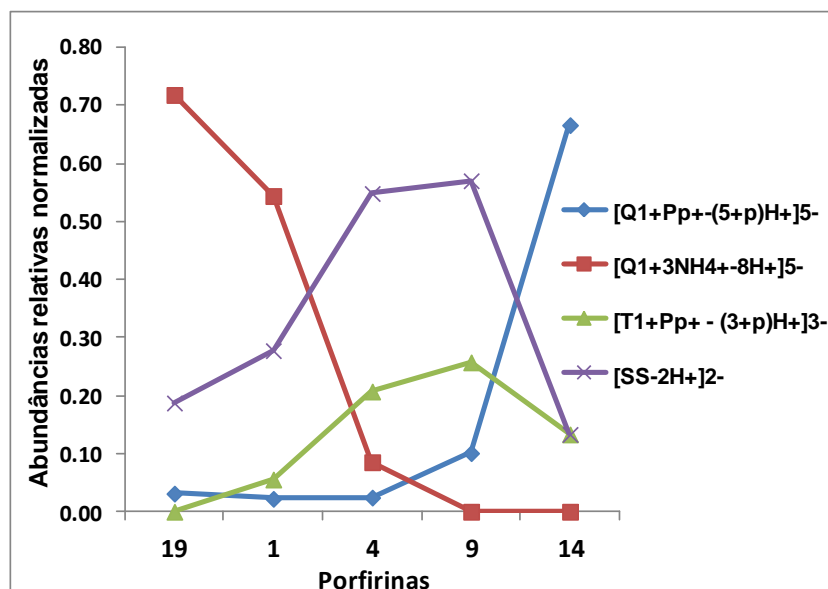


Figura 86 - Abundâncias relativas normalizadas dos íões-produto do precursor $[Q1+3NH_4^++P^{p+}-(8+p)H^+]^{5-}$ com as porfirinas **1**, **4**, **9**, **14** e **19**

A formação de espécies "unfilled" é dominante para as porfirinas com maior número de cargas, devido ao aumento das interações eletrostáticas entre cada porfirimina e os grupos fosfato do quadruplex. Por outro lado, os fragmentos formados por perdas de espécies neutras $(P^{p+}-pH^+)^0$ só são significativos para a porfirimina neutra, **19**, e para a porfirimina **1** (uma carga positiva). Estes fragmentos são também observados para porfirimina **4** (duas cargas positivas), com baixa abundância e para a porfirimina **9** com abundância muito baixa.

A observação ou não observação dos sinais correspondentes à perda da porfirimina neutra pode estar relacionada com a facilidade da sua formação por desprotonação. Valores de basicidade/acidez em fase gasosa para as porfirinas estudadas não estão disponíveis e mesmo em solução os dados são escassos,³⁶ embora o pKa correspondente à perda do primeiro próton interior da porfirimina **14** tenha sido determinado em 1970 (pKa = 12,9).³⁷

Mais recentemente, valores de pKa acima de 12, foram determinados para o primeiro equilíbrio de desprotonação da porfirimina **14**, quando foi estudada a sua interação com tensoativos iônicos e não iônicos. Foi proposto que o aumento do pKa observado quando se usava um tensoactivo aniónico podia estar relacionado com a blindagem dos grupos metilpiridilo pelas cabeças aniónicas do tensoactivo.

Um efeito indutivo semelhante, embora menos intenso, pode ser causado pela cadeia de fosfatos dos quadruplexes, aumentando a densidade eletrónica do anel conjugado da porfirina e, conseqüentemente, diminuindo a sua tendência a perder os prótons interiores.

As cadeias simples d(TG₄T) e d(T₂G₅T) são semelhantes em termos de tipos de bases presentes, embora o seu comprimento não seja o mesmo. Por este facto, não era previsível uma discrepância significativa entre a fragmentação dos aductos $[Q+nNH_4^++P^{p+}-(z+n+p)H^+]^{z-}$ dos dois quadruplexes.

A análise da fragmentação dos pares de aductos $[Q1+3NH_4^++P^{p+}-(7+p)H^+]^{4-}/[Q2+4NH_4^++P^{p+}-(9+p)H^+]^{5-}$ e $[Q1+3NH_4^++P^{p+}-(8+p)H^+]^{5-}/[Q2+4NH_4^++P^{p+}-(10+p)H^+]^{6-}$ ($p = 0-4$) vem confirmar a semelhança esperada, como pode ser visto na figura 87. Nesta figura apresentam-se os gráficos das abundâncias relativas dos iões-produto dos aductos $[Q1+3NH_4^++P^{4+}-12H^+]^{5-}$ e $[Q2+4NH_4^++P^{4+}-14H^+]^{6-}$ com a porfirina 14, a um mesmo valor de energia de colisão (20 eV).

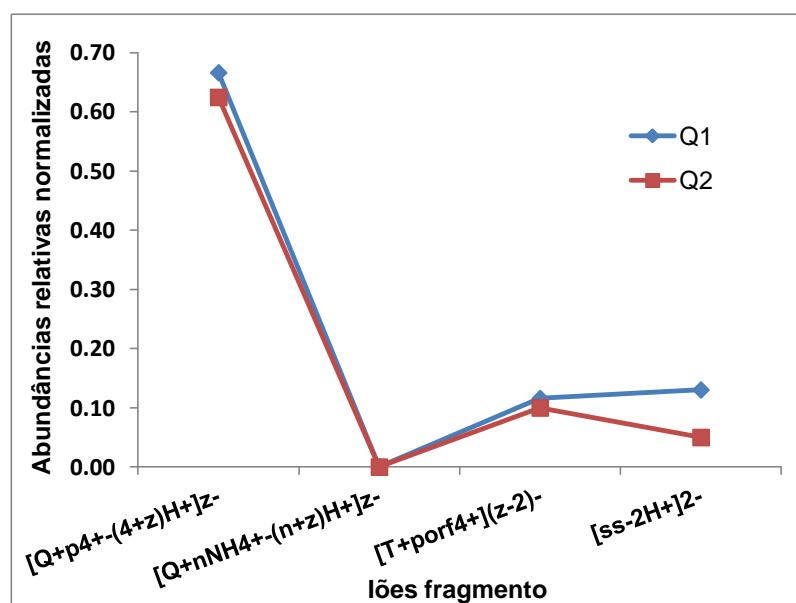


Figura 87 - Abundâncias relativas dos iões-produto do espectro de iões-produto obtidos a partir dos iões precursores $[Q1+3NH_4^++P^{4+}-12H^+]^{5-}$ e $[Q2+4NH_4^++P^{4+}-14H^+]^{6-}$ dos quadruplexes Q1 e Q2 com a porfirina 14

5.2A.3 - Comportamento geral dos aductos

Embora se tenham detectado diferentes padrões de fragmentação para as diferentes porfirinas estudadas, o comportamento dos aductos com as porfirinas com maior número de cargas é muito semelhante e resulta principalmente na formação de espécies “unfilled” por perda de moléculas de NH_3 , mantendo-se a porfirina ligada à estrutura do quadruplex.

As principais diferenças observadas para as restantes porfirinas foram:

- para as porfirinas neutra e com uma carga positiva, o processo de fragmentação dominante resulta da perda de porfirina com formação da estrutura do quadruplex, $[\text{Q} + n\text{NH}_4^+ - (z+n)]^{z-}$;

- para as porfirinas com duas e três cargas, o padrão de fragmentação resulta de dois processos competitivos, por um lado, há perda das moléculas de NH_3 mantendo-se a porfirina ligada à estrutura do quadruplex, com formação de espécies “unfilled”, $[\text{Q} + \text{P}^{p+} - (z+p)\text{H}^+]^{z-}$, por outro verifica-se perda de porfirina;

Verificaram-se ainda diferenças no comportamento dos aductos com menor e maior carga global: para os últimos a sua fragmentação envolve separação de cadeias.

O tipo e tamanho dos grupos substituintes periféricos presentes na estrutura da porfirina para um mesmo valor de carga, não mostraram ter uma influência significativa nos processos de fragmentação observados. Verificou-se um comportamento semelhante para as porfirinas contendo substituintes com cadeias alquílicas mais curtas, grupos metilo, e mais longas, grupos dodecilo. Um comportamento análogo foi também observado na presença de um grupo substituinte mais volumoso, o grupo trimetilamoniofenilo.

5.2B - Estudo dos aductos das porfirinas 2, 3, 5 a 8, 11 e 13 com os quadruplexes Q1 e Q2

O estudo das interacções entre as porfirinas catiónicas **2**, **3**, **5** a **8**, **11** e **13** e dois quadruplexes tetramoleculares Q1 e Q2 formados a partir das sequências TG₄T e T₂G₅T foi também efectuado por ESI-MS e ESI-MS/MS.

As porfirinas diferem entre si no número de cargas positivas, um a três, e no tipo de substituintes não carregados, com átomos electroattractores (grupos 2,3,6-trifluorofenil e pentafluorofenil). No caso das porfirinas com duas cargas positivas foi comparado o comportamento dos aductos de dois pares de isómeros geométricos ou *cis-trans* (porfirinas **5**, **6** e **7**, **8**).

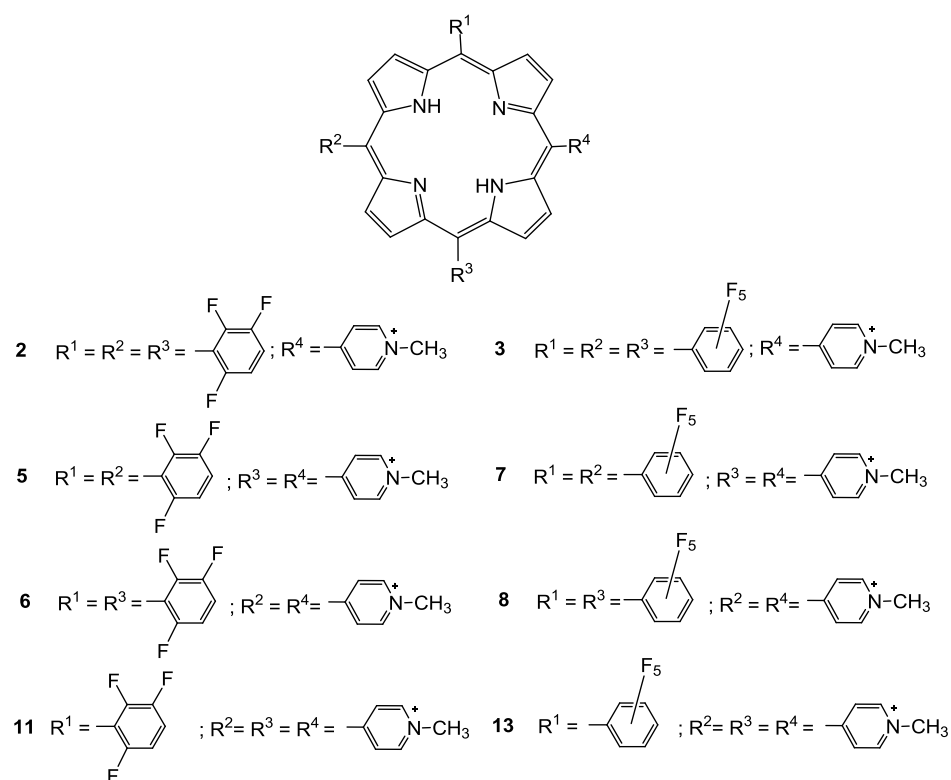


Figura 88 - Porfirinas estudadas

5.2B.1 - Espectros de massa

Tal como foi descrito na parte A, os espectros de massa correspondentes às soluções oligonucleotídeo-porfirina mostraram além dos sinais dos quadruplexes, com três e quatro catiões amónio, $[Q1+3NH_4^+-7H^+]^{4+}$, $[Q1+3NH_4^+-8H^+]^{5+}$, $[Q2+4NH_4^+-9H^+]^{5+}$, $[Q2+4NH_4^+-10H^+]^{6+}$, os iões correspondentes à estrutura da cadeia simples $[d(TG_4T)-zH^+]^{z+}$, $[d(T_2G_5T)-zH^+]^{z+}$ ($z=2$ e 3) e também os aductos quadruplex-porfirina, com carga negativa variável entre quatro e seis, nomeadamente, $[Q1+3NH_4^++P^{p+}-(7+p)H^+]^{4+}$, $[Q1+3NH_4^++P^{p+}-(8+p)H^+]^{5+}$, $[Q2+4NH_4^++P^{p+}-(9+p)H^+]^{5+}$ e $[Q2+4NH_4^++P^{p+}-(10+p)H^+]^{6+}$ ($p = 1$ a 3), sendo as suas abundâncias relativas variáveis com os oligonucleotídeos e com as porfirinas. Em contraste com o que se verificou para as porfirinas catiónicas descritas na parte A, nos espectros de massas das soluções anteriores foi detectada, em alguns casos, a presença de iões correspondentes às porfirinas $[P^{p+}-(p+1)H^+]^{+}$.

As características descritas anteriormente podem ser observadas nas figuras **89** e **90** onde se apresentam os espectros de massa das porfirinas **2** e **11** ($p=1$ e 3) com o quadruplex Q2 e das porfirinas **7** e **8** ($p=2$) com o quadruplex Q1, respectivamente.

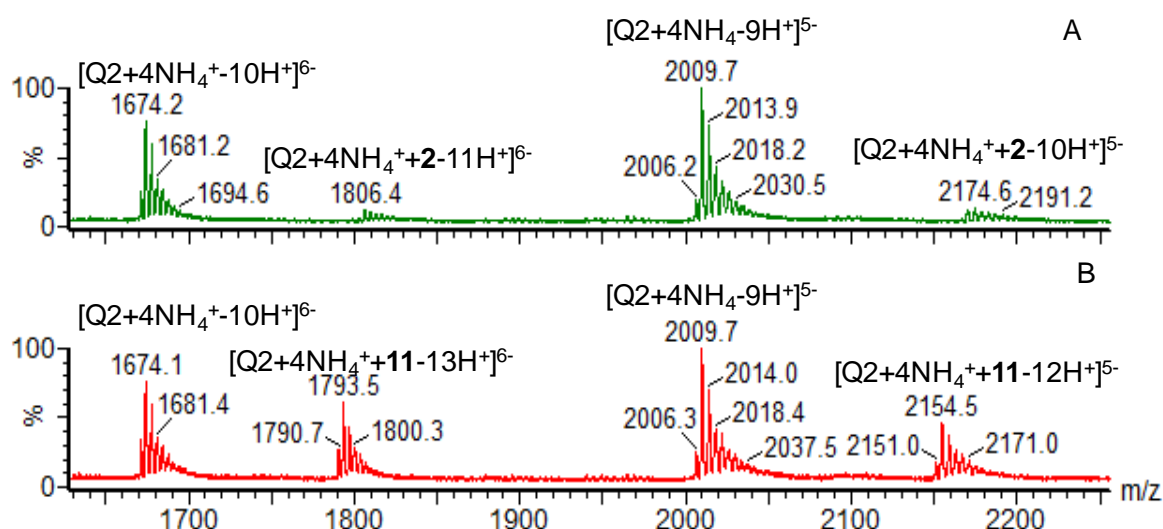


Figura 89 - Espectros de massa das soluções de Q2 com: A - porfirimina **2**;
B - porfirimina **11**

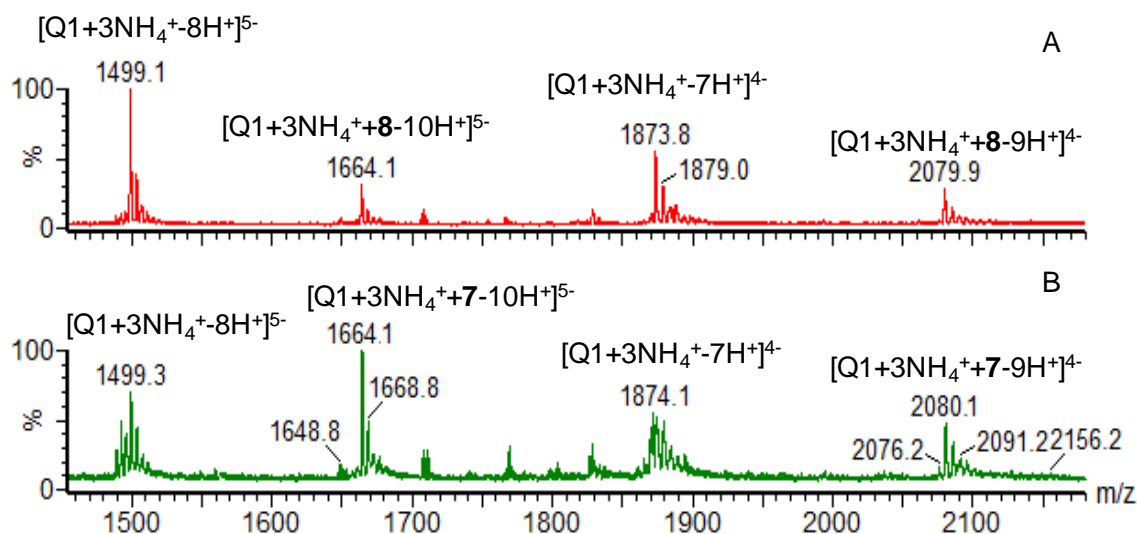


Figura 90 - Espectros de massa das soluções de Q1 com: A - porfirina 8;
B - porfirina 7

Os aductos com maiores abundâncias relativas foram observados para as porfirinas com três cargas positivas. No que diz respeito aos pares de isômeros, os aductos com as porfirinas com substituintes em posições *cis* (porfirinas 5 e 7) apresentaram maiores abundâncias relativas que os aductos dos respectivos isômeros *trans* (porfirinas 6 e 8). Estas tendências podem ser observadas nas figuras 91 e 92 onde se apresentam os gráficos das abundâncias relativas daqueles aductos.

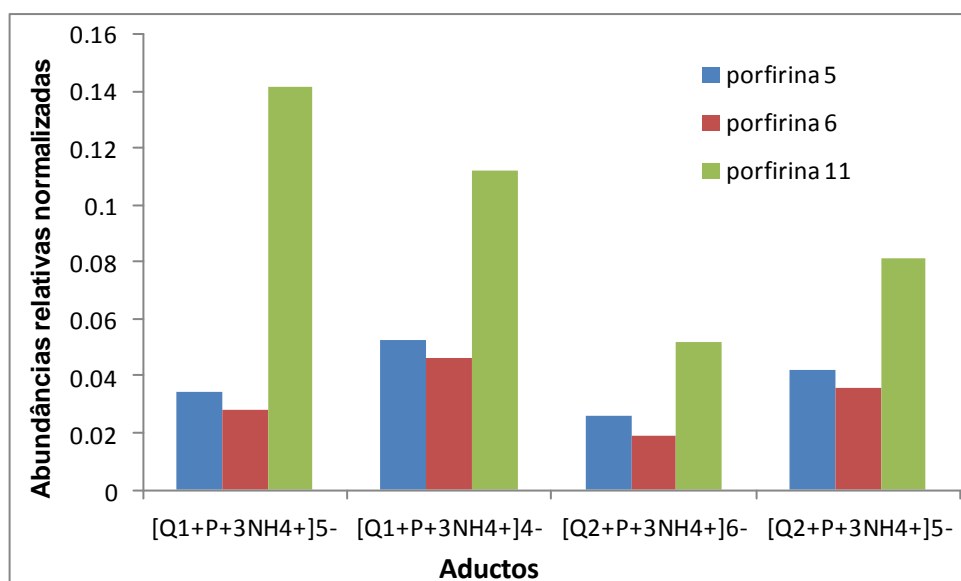


Figura 91 - Abundâncias relativas normalizadas em relação ao somatório das abundâncias de todos os aductos para as porfirinas 5, 6 e 11

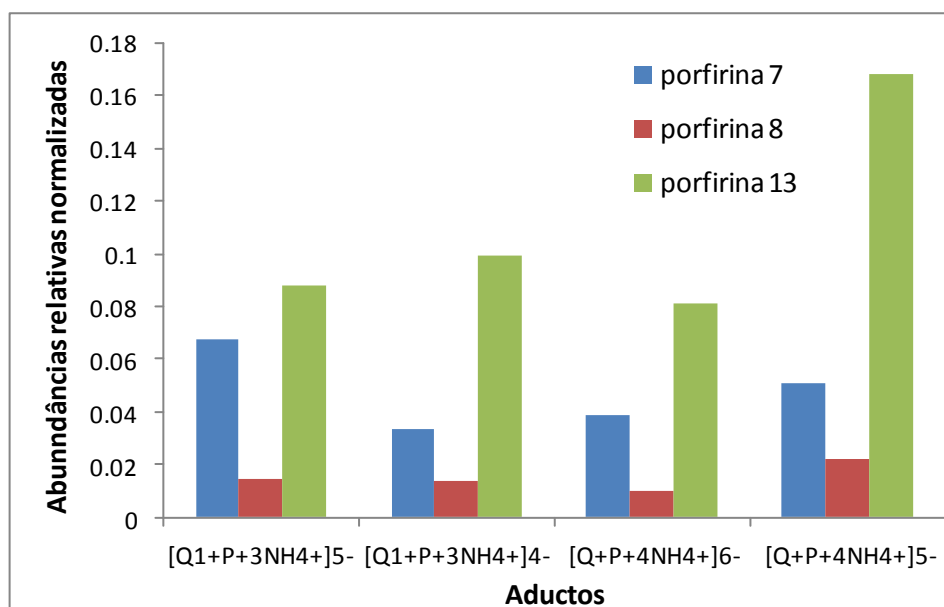


Figura 92 - Abundâncias relativas normalizadas em relação ao somatório das abundâncias de todos os adutos para as porfirinas **7**, **8** e **13**

Tal como no caso das porfirinas estudadas na parte A, partimos do pressuposto que as estruturas dos adutos dos quadruplexes, Q1 e Q2, com as porfirinas, correspondem às formas canónicas, com quatro cadeias paralelas e com os catiões NH_4^+ localizados entre tétradas adjacentes.^{7,12}

5.2B.2 - Espectros de iões-produto

Adutos com menor carga negativa global - $[\text{Q1}+3\text{NH}_4^++\text{P}^{\text{p}+}-(7+\text{p})\text{H}^+]^{4-}$ e $[\text{Q2}+4\text{NH}_4^++\text{P}^{\text{p}+}-(9+\text{p})\text{H}^+]^{5-}$

Tal como no caso das porfirinas estudadas na parte A, os adutos com menor número de cargas negativas, -4 para Q1 e -5 para Q2, fragmentam-se sem separação de cadeias, mantendo-se as estruturas dos quadruplexes. Os espectros de iões-produto destes adutos são semelhantes e os iões-fragmento mais abundantes resultam de perdas de três e quatro moléculas de NH_3 , ou seja, correspondem aos quadruplexes “unfilled” de fórmula geral $[\text{Q}+\text{P}^{\text{p}+}-(z+\text{p})\text{H}^+]^{z-}$. Os iões-fragmento correspondentes à perda de porfirina $[\text{Q}+n\text{NH}_4^+-(n+z)\text{H}^+]^{z-}$ são também observados embora com abundâncias relativas baixas.

Na figura **93** são apresentados os espectros de iões-produto do quadruplex Q2 com as porfirinas **2**, **5**, **6** e **11** com substituintes 2,3,6-trifluorofenilo.

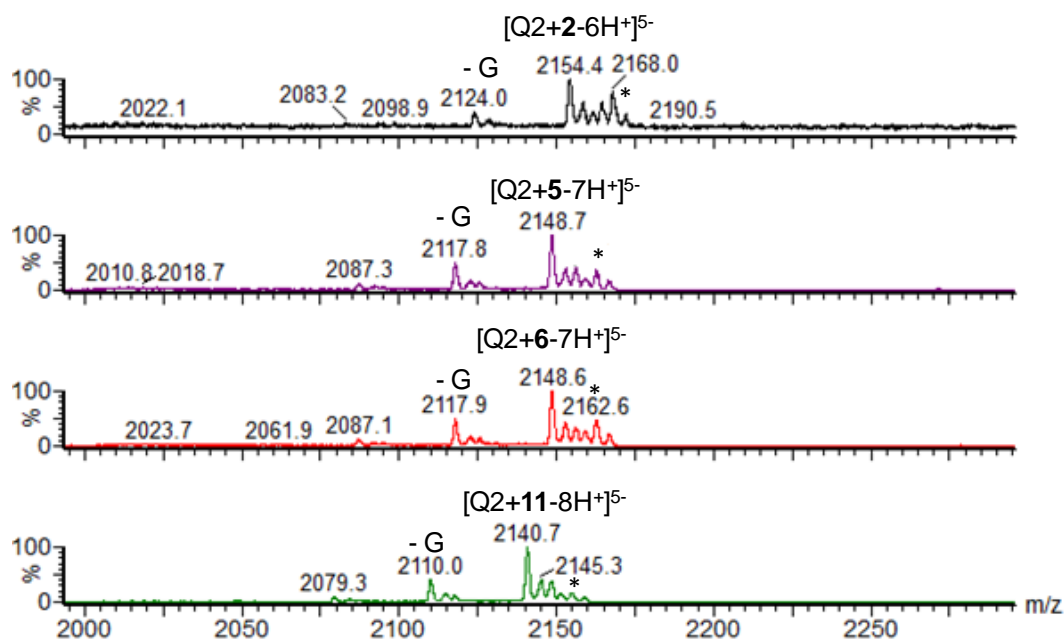


Figura 93 - Espectros de iões-produto dos aductos do quadruplex Q2 com as porfirinas **2**, **5**, **6** e **11** (* - ião precursor):

A - [Q2+4NH₄⁺+2-10H⁺]⁵⁻; B - [Q2+4NH₄⁺+5-11H⁺]⁵⁻; C - [Q2+4NH₄⁺+6-11H⁺]⁵⁻; D - [Q2+4NH₄⁺+11-12H⁺]⁵⁻

Os resultados obtidos para os aductos com menor carga global, quando comparados com os resultados obtidos para as porfirinas do grupo A, indicam uma variação menos pronunciada do processo de fragmentação com o aumento do número de cargas das porfirinas, embora se observem maiores abundâncias relativas das espécies “unfilled” para os aductos das porfirinas com maior número de cargas, porfirinas **11** e **13** (três cargas positivas).

Por outro lado, nos espectros de iões-produto dos elementos dos dois pares de isómeros *cis* e *trans* (porfirinas **5**, **6** e **7**, **8**), verificam-se diferenças nas abundâncias relativas dos precursores: nas mesmas condições experimentais as abundâncias relativas dos precursores *trans* são mais elevadas do que as dos precursores *cis*. Este comportamento pode ser observado na figura **94** onde estão representados os espectros de iões-produto dos aductos do quadruplex Q1 com

as porfirinas **5**, **6**, **7** e **8**, com duas cargas positivas e dois substituintes 2,3,6-fluorofenil e pentafluorofenil.

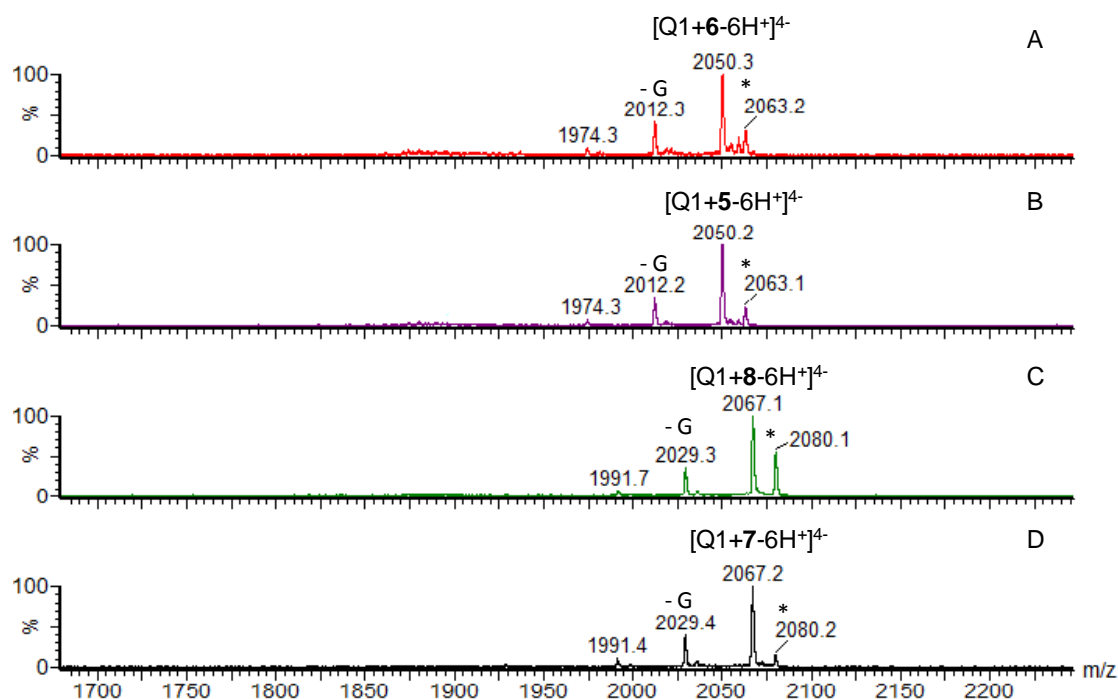


Figura 94 - Espectros de íões-produto dos aductos (identificado por *) do quadruplex Q1 com as porfirinas **5** a **8** (* - íão precursor):

A - [Q1+3NH₄⁺+6-9H⁺]⁴⁺; B - [Q1+3NH₄⁺+5-9H⁺]⁴⁺; C - [Q1+3NH₄⁺+8-9H⁺]⁴⁺;
D - [Q1+3NH₄⁺+7-9H⁺]⁴⁺;

Também de um modo semelhante ao que acontece no caso dos aductos das porfirinas da parte A, não se verificam diferenças significativas no padrão de fragmentação para os dois quadruplexes. Este comportamento pode ser observado nas figuras **95** e **96** onde se representam as abundâncias relativas dos íões-produto dos aductos [Q1+3NH₄⁺+P^{p+}-(4+p)H⁺]⁴⁺ e [Q2+4NH₄⁺+P^{p+}-(5+p)H⁺]⁵⁺ com as porfirinas **5** a **8**, **11** e **13**, para os mesmos valores de energia de colisão (30 eV).

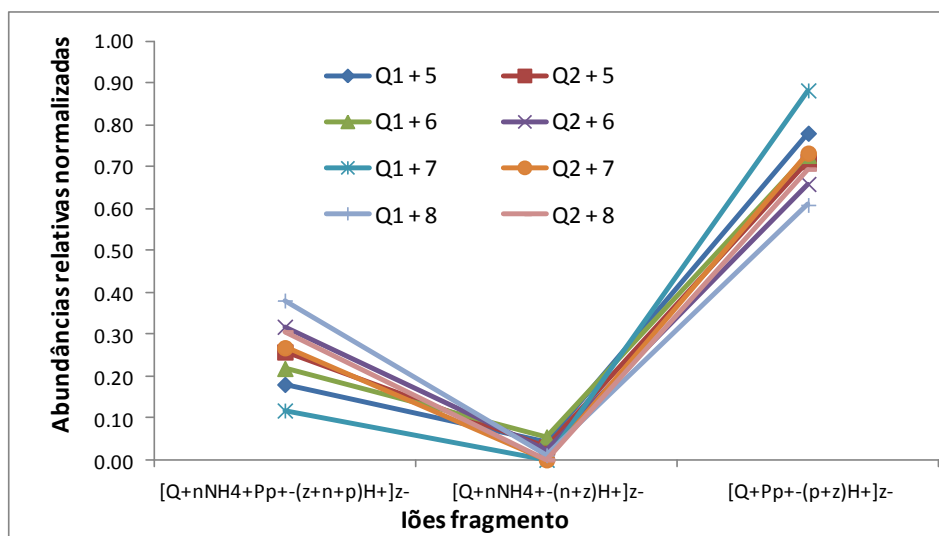


Figura 95 - Abundâncias relativas normalizadas dos íões-produto dos aductos $[Q1+3NH_4^++P^{2+}-9H^+]^{4-}$ e $[Q2+4NH_4^++P^{2+}-11H^+]^{5-}$ ($p=2$) com as porfirinas **5 a 8**

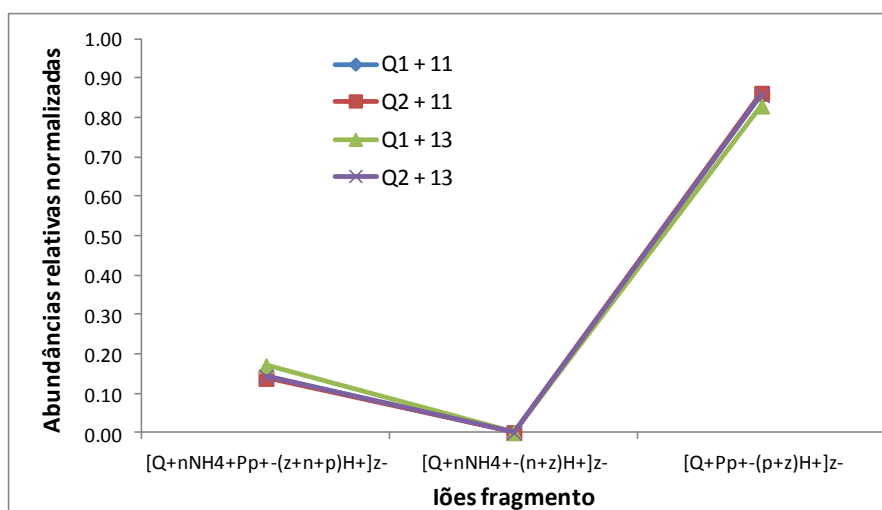


Figura 96 - Abundâncias relativas normalizadas dos íões-produto dos aductos $[Q1+3NH_4^++P^{3+}-10H^+]^{4-}$ e $[Q2+4NH_4^++P^{3+}-12H^+]^{5-}$ ($p= 3$) com as porfirinas **11 e 13**

Aductos com maior carga negativa global - $[Q1+3NH_4^++P^{p+}-(8+p)H^+]^{5-}$ e $[Q2+4NH_4^++P^{p+}-(10+p)H^+]^{6-}$

Tal como no caso das porfirinas estudadas na parte A, o comportamento dos aductos com maior número de cargas negativas, -5 para Q1 e -6 para Q2 é diferente do comportamento dos correspondentes aductos com menor carga global e a sua fragmentação envolve separação de cadeias.

Para todas as porfirinas estudadas e para os dois quadruplexes os fragmentos mais abundantes são os iões $[d(TG_4T)]_3 + P^{p+} - (z-p)H^+]^{3-}$ e $[d(T_2G_5T)]_3 + P^{p+} - (z-p)H^+]^{4-}$ dos pares $[d(TG_4T)]_3 + P^{p+} - (z-p)H^+]^{3-} / [d(TG_4T) - 2H^+]^{2-}$ e $[d(T_2G_5T)]_3 + P^{p+} - (z-p)H^+]^{4-} / [d(T_2G_5T) - 2H^+]^{2-}$ para Q1 e Q2, respectivamente. Tal como na secção A por uma questão de simplicidade vai passar a usar-se a notação T1 para $[d(TG_4T)]_3$ e T2 para $[d(T_2G_5T)]_3$. Os segundos iões-produto mais abundantes são os iões correspondentes às cadeias simples $[d(TG_4T) - 2H^+]^{2-}$ e $[d(T_2G_5T) - 2H^+]^{2-}$. As espécies “unfilled” $[Q + P^{p+} - (z+p)H^+]^{z-}$ são também formadas, mas com menor abundância relativa.

Na figura 97 são apresentados os espectros de iões-produto do quadruplex Q2, $[Q2 + 4NH_4^+ + P^{p+} - (10+p)H^+]^{6-}$ com as porfirinas **2**, **5**, **6** e **11** com substituintes 2,3,6-trifluorofenilo.

Para estes aductos, tal como no caso dos seus homólogos com menor carga global, não se observa uma variação muito pronunciada da fragmentação com o aumento do número de cargas da porfirina, no entanto verifica-se uma maior variação nas abundâncias relativas dos iões-fragmento.

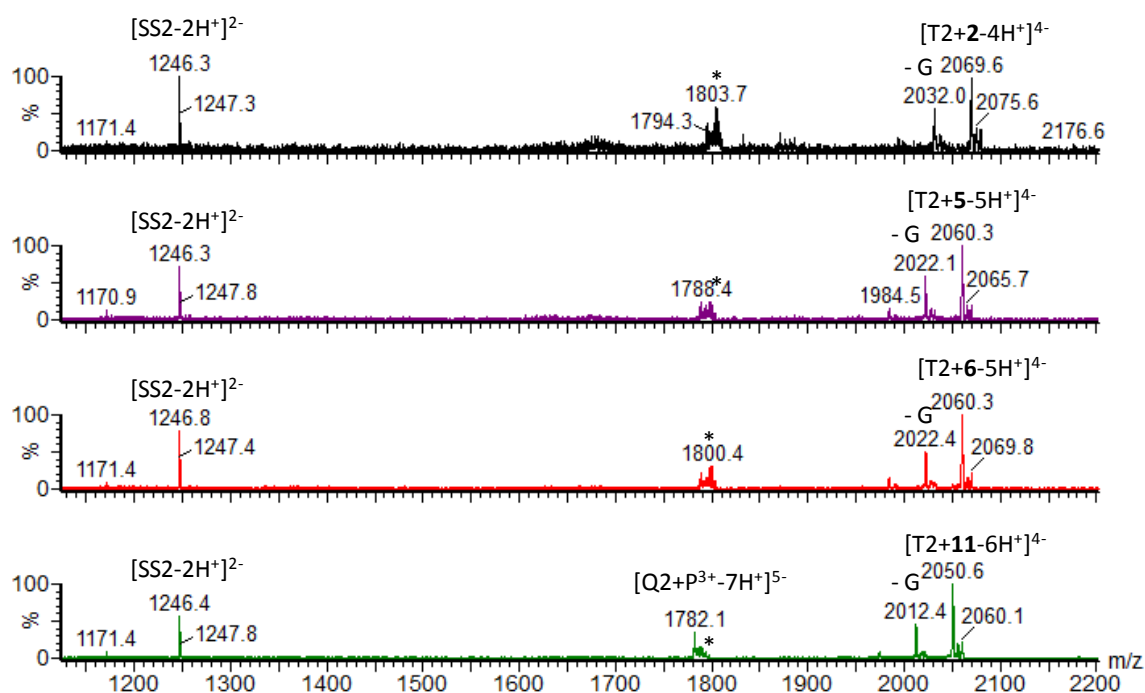


Figura 97 - Espectros de iões-produto dos aductos $[Q2 + 4NH_4^+ + P^{p+} - (10+p)H^+]^{6-}$ ($p = 1$ a 3) com as porfirinas:

A - porfirina **2**; B - porfirina **5**; C - porfirina **6** e D - porfirina **11**

Tal como para os aductos com menor carga global, verificam-se diferenças nas abundâncias relativas dos iões precursores, nos espectros de iões-produto para cada um dos elementos dos dois pares de isómeros *cis* e *trans* (porfirinas **5**, **6** e **7**, **8**). Nas mesmas condições experimentais as abundâncias relativas dos precursores *trans* são mais elevadas do que as dos precursores *cis*.

Os comportamentos atrás descritos são ilustrados na figura **98** onde se representam as abundâncias relativas dos precursores $[Q1+3NH_4^++P^{p+}-(8+p)H^+]^{5-}$ e dos principais iões-produto para as porfirinas **3**, **7**, **8** e **13**, com uma, duas e três cargas positivas e substituintes pentafluorofenilo ($p= 1$ a 3).

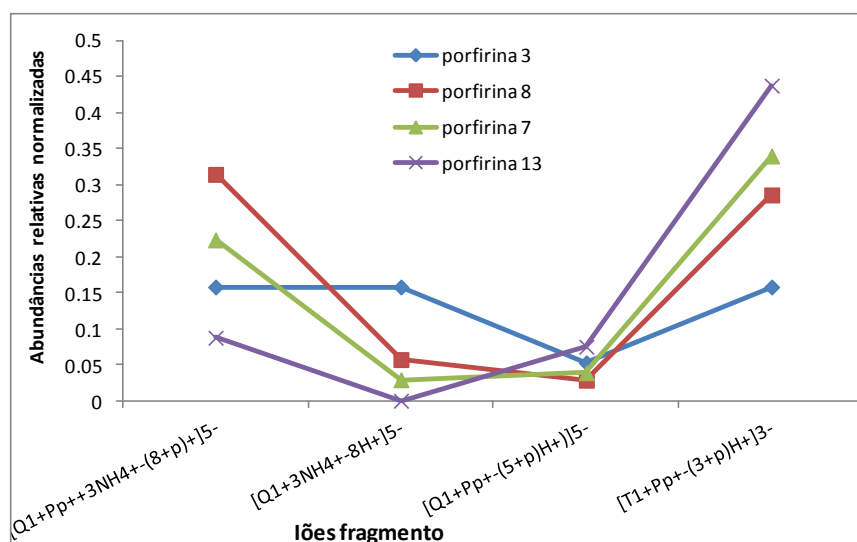


Figura 98 - Abundâncias relativas normalizadas dos iões-produto dos aductos $[Q1+3NH_4^++P^{p+}-(8+p)H^+]^{5-}$ com as porfirinas **3**, **7**, **8** e **13**

Também tal como acontece no caso dos aductos das porfirinas da parte A e dos aductos deste grupo com menor carga global, não há diferenças muito significativas no padrão de fragmentação para os dois quadruplexes. São observadas algumas diferenças para as porfirinas com uma carga positiva, porfirinas **2** e **3**, por exemplo, para os seus aductos com o quadruplex Q1 observam-se iões correspondentes à perda de porfirina, $[Q+nNH_4^+-(z+n)H^+]H^+{}^z$, que praticamente não se formam no caso do quadruplex Q2.

Este comportamento é ilustrado na figura **99** onde se apresentam as abundâncias relativas normalizadas dos iões-produto dos aductos $[Q1+3NH_4^++P^{p+}-$

$9\text{H}^+]$ ⁵⁻ e $[\text{Q}2+4\text{NH}_4^++\text{P}^+-11\text{H}^+]$ ⁶⁻ com as porfirinas **2** e **3**, a um mesmo valor de energia de colisão.

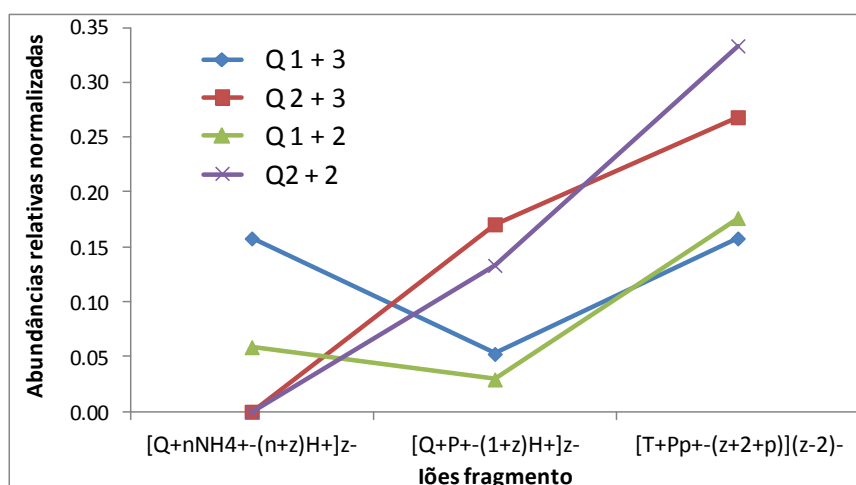


Figura 99 - Abundâncias relativas normalizadas dos íões-produto dos aductos $[\text{Q}1+3\text{NH}_4^++\text{P}^+-9\text{H}^+]$ ⁵⁻ e $[\text{Q}2+4\text{NH}_4^++\text{P}^+-11\text{H}^+]$ ⁶⁻ com as porfirinas **2** e **3**.

As diferenças de comportamento dos aductos para os dois quadruplexes são pouco significativas no caso dos aductos com as porfirinas com três cargas positivas, porfirinas **11** e **13**, como se pode ver na figura **100** onde estão representadas as abundâncias relativas normalizadas dos íões-produto dos aductos $[\text{Q}1+3\text{NH}_4^++\text{P}^{3+}-11\text{H}^+]$ ⁵⁻ e $[\text{Q}2+4\text{NH}_4^++\text{P}^{3+}-13\text{H}^+]$ ⁶⁻ com as porfirinas **11** e **13** ($p=3$).

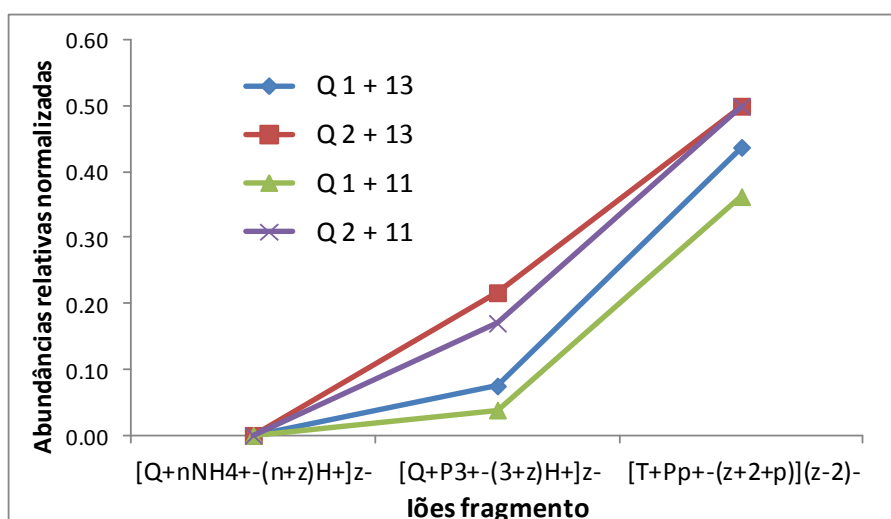


Figura 100 - Abundâncias relativas normalizadas dos íões-produto dos aductos $[\text{Q}1+3\text{NH}_4^++\text{P}^{3+}-11\text{H}^+]$ ⁵⁻ e $[\text{Q}2+4\text{NH}_4^++\text{P}^{3+}-13\text{H}^+]$ ⁶⁻ com as porfirinas **11** e **13**

5.2B.3 - Comportamento geral dos aductos

Os resultados anteriores não mostraram diferenças muito significativas para o conjunto das diferentes porfirinas estudadas, quer em termos do número de cargas das porfirinas, quer em termos dos substituintes presentes. Por exemplo, seria previsível que o comportamento dos aductos das porfirinas contendo uma carga positiva e 3 grupos pentafluorfenilo e contendo uma carga positiva e 3 grupos 2,3,6-trifluorfenilo fosse diferente, o que não se verificou.

As principais diferenças foram observadas nas abundâncias relativas dos aductos das porfirinas com duas cargas e com substituintes em posições *cis* / *trans*.

Tal como para o grupo de porfirinas estudado na parte A, verificaram-se diferenças no comportamento dos aductos com menor e maior carga global e para os últimos a sua fragmentação envolve separação de cadeias.

5.3 - Conclusões

De um modo geral, o comportamento em fase gasosa dos aductos $[Q+nNH_4^++P^{p+}-(z+n+p)H^+]^{z-}$ é fortemente dependente da carga da porfirina, p^+ , não sendo observadas alterações muito significativas no comportamento dos aductos quadruplex-porfirina no caso de porfirinas com igual número de cargas. A semelhança de comportamento daqueles aumenta com o número de cargas das porfirinas.

No caso das porfirinas com maior número de cargas, a presença da porfirina, estabiliza a estrutura do quadruplex, mesmo na ausência de iões NH_4^+ , (formação dos espécies “unfilled” $[Q+P^{p+}-(z+p)H^+]^{z-}$), tornando o processo de separação das cadeias muito menos acentuado. A formação predominante daquelas espécies para as porfirinas com quatro cargas positivas, mesmo quando a repulsão entre as cadeias é maior (aductos com carga global mais elevada) é comprovativa do comportamento anterior.

A perda de porfirina conduzindo à formação dos iões $[Q+nNH_4^+-(z+n)H^+]^{z-}$ é predominante para a porfirina neutra e para as porfirinas com uma carga positiva e resulta, não só da menor atracção electrostática entre o quadruplex e as porfirinas, mas também da maior facilidade de formação, por desprotonação, da espécie neutra, $(P^+-H^+)^0$.

A fragmentação dos aductos $[Q+nNH_4^++P^{p+}-(z+n+p)H^+]^{z-}$ é também dependente da sua carga global, uma vez que as repulsões entre cadeias aumentam com o aumento do valor de z .

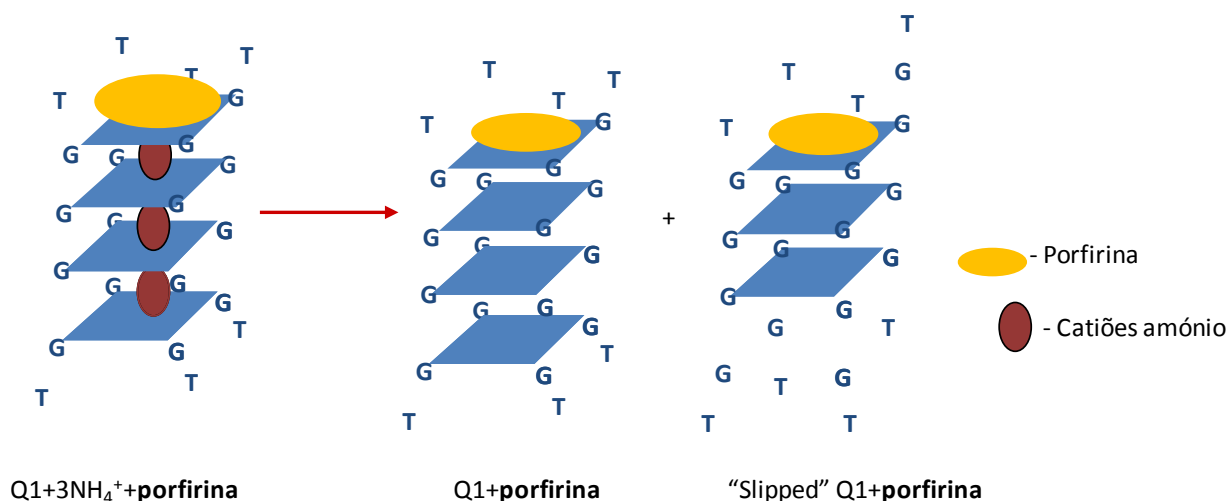
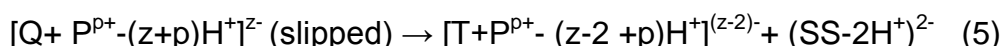
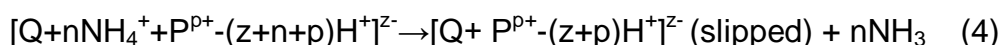
Os padrões de fragmentação gerais dos aductos $[Q+nNH_4^++P^{p+}-(z+n+p)H^+]^{z-}$ são:

- (1) $[Q+nNH_4^++P^{p+}-(z+n+p)H^+]^{z-} \rightarrow [Q+nNH_4^+-(z+n)H^+]^{z-} + (P^{p+}-pH^+)^0$
- (2) $[Q+nNH_4^++P^{p+}-(z+n+p)H^+]^{z-} \rightarrow [T+P^{p+}-(z-2+p)H^+]^{(z-2)-} + (SS-2H^+)^{2-} + nNH_3$
- (3) $[Q+nNH_4^++P^{p+}-(z+n+p)H^+]^{z-} \rightarrow [Q+P^{p+}-(z+p)H^+]^{z-} + nNH_3$

Para a porfirimina neutra e para as porfirinas monocarregadas, a perda de porfirimina é predominante sobre a separação de cadeias (1). O processo de separação de cadeias com a formação dos iões $[T+P^{p+}-(z-2+p)H^+]^{(z-2)-}$ predomina para as porfirinas com duas e três cargas positivas (2). Para porfirinas com quatro cargas positivas o processo dominante é a formação das espécies "unfilled" $[Q+P^{p+}-(z+p)H^+]^{z-}$ (3).

O papel dos iões NH_4^+ na formação dos quadruplexes, (posicionamento entre as tétradas de guanina e especificidade da sua ligação aos oxigénios O6 daquelas), é indicativo de uma ligação externa das porfirinas, provavelmente por empilhamento, para todos os aductos estudados.

Se o empilhamento externo, proposto por outros autores³⁰, for assumido como modo de ligação, é provável que as espécies "unfilled" $[Q+P^{p+}-(z+p)H^+]^{z-}$, (com a porfirimina empilhada num dos extremos do quadruplex) não se encontrem apenas nas formas canónicas e que existam também estruturas "slipped"⁴¹, com menos uma tétrada de guanina (esquema 11). A formação dessas estruturas pode ser o primeiro passo no processo de separação de cadeias observado: formação das espécies $[T+P^{p+}-(z-2+p)H^+]^{(z-2)-}$, com a porfirimina ligada à três cadeias e $[SS-2H^+]^{2-}$, esta última correspondendo à cadeia "deslocada", ou seja:



As diferenças de comportamento observadas entre as porfirinas do grupo A (p= 0 a 4) e B (p=1 a 3), poderá ser explicada, pelo menor intervalo de cargas positivas e pela presença de um número elevado de átomos de flúor, no segundo caso. Os átomos de flúor com o seu efeito electroatractor, diminuem a densidade de carga negativa do macrociclo e reforçam o efeito das cargas positivas dos grupos metilpiridínio.

Resumindo:

- a formação de aductos com fórmula geral, $[Q+nNH_4^++P^{p+}-(z+n+p)H^+]^{z-}$ para os dois quadruplexes e para todas as porfirinas estudadas é indicativa de ligação externa da porfirina ao quadruplex, provavelmente por empilhamento
- a presença da porfirina por si só confere estabilidade ao G-quadruplex, não sendo necessária a presença de qualquer catião estabilizador adicional
- a estabilidade dos aductos aumenta, em geral, com o número de cargas das porfirinas
- a estabilidade dos aductos não depende significativamente dos grupos substituintes, excepto nos caso em que estes consigam diminuir a densidade electrónica do macrociclo porfirínico

5.4 - Parte experimental: otimização de métodos e parâmetros instrumentais

Foram seleccionados oligonucleotídeos contendo um diferente número de guaninas consecutivas na sua cadeia simples (três a cinco). A presença de guaninas consecutivas (um mínimo de três) é necessária para se formarem G-quadruplexes. Pretendiam-se usar, neste estudo, sequências de diferentes tamanhos e com um número de bases variável (6 a 12), de forma a ser possível estudar a sua influência na formação dos aductos.

As sequências dos vários oligonucleotídeos estudados estão indicadas na tabela seguinte.

Tabela 13 - Sequências de oligonucleotídeos utilizadas e respectivas massas monoisotópicas e fórmulas elementares

Nº de bases	Sequências	Massa monoisotópica	Fórmula elementar (cadeia simples)
6	TTAGGG	1846.3515	C ₆₀ H ₇₅ N ₂₄ O ₃₅ P ₅
6	TGGGGT	1862.3464	C ₆₀ H ₇₅ N ₂₄ O ₃₆ P ₅
8	TTGGGGGT	2495.4450	C ₈₀ H ₁₀₀ N ₃₁ O ₄₉ P ₇
12	TTTTGGGGTTTT	3686.6226	C ₁₂₀ H ₁₅₃ N ₃₆ O ₇₈ P ₁₁

5.4.1 - Optimização das condições experimentais no Q-ToF

5.4.1.1 - Preparação das amostras

Numa primeira fase, tendo como base as condições experimentais usadas anteriormente por nós^{31,32} e estudos idênticos referidos por outros autores,⁷ foram testadas diversas condições para a preparação das amostras, tais como temperatura de preparação, concentração da solução tampão e tempo de arrefecimento. No que diz respeito ao espectrómetro de massa foram testados parâmetros como temperaturas da fonte e de dessolvatação, voltagens do capilar e do cone e fluxo de introdução da amostra.

As condições foram alteradas até se obterem espectros de massa com sinais de intensidade apreciável, suficiente para permitir a obtenção de espectros de iões-produto com uma boa razão sinal / ruído.

Na tabela seguinte são apresentadas as condições experimentais testadas para a formação do quadruplex $[d(TG_4T)]_4$ (Q1) a partir das cadeias simples.

Tabela 14 - Condições experimentais testadas para formação de Q1

Temperatura do banho (°C)	Tempo de aquecimento (min.)	Tempo de arrefecimento	Conc. acetato de amónio (M)
85	45	“overnight”, temperatura ambiente	0.05
95			
100			
85	45	“overnight”, temperatura ambiente	0.50
95			
100			
85	45	“overnight”, temperatura ambiente	1.00
95			
100			

Para além das condições anteriormente referidas foram também testadas diferentes misturas amostra/eluente (v/v), 1:2, 1:3 e 1:5. Pelas razões indicadas no sub-capítulo 5.2, o eluente escolhido foi o metanol.

As várias combinações testadas mostraram que, numa primeira aproximação, os espectros de massa que apresentavam sinais com intensidades mais elevadas eram obtidos para as seguintes condições: temperatura de aquecimento 85°C e concentração de acetato de amónio de 0.5M, proporção de oligonucleotídeo/metanol 1:3. No entanto, os espectros não apresentavam ainda sinais com a intensidade adequada.

Foram então testados diferentes tempos e modos de arrefecimento da amostra, tendo como base trabalhos anteriores³⁸ que referiam que a colocação directa da amostra em gelo, após o aquecimento, favorecia a formação da estrutura do quadruplex. A aplicação deste procedimento melhorou os sinais obtidos, no entanto a sua intensidade ainda era baixa. Os espectros apresentavam ruído considerável e era observada uma forte contribuição de aductos de sódio e de amónio, para além dos esperados (figura **101 B**).

Na tentativa de eliminar a contribuição destes últimos e assim aumentar a intensidade dos sinais correspondentes ao quadruplex, foi usada uma resina de troca iónica. A utilização desta resina resolveu parcialmente o problema, uma vez que se obtiveram espectros com sinais mais intensos e menor número de aductos indesejados (figura **101 A**). Na figura seguinte são apresentados os espectros de massa obtidos para as soluções de Q1 com e sem tratamento prévio da amostra com resina.

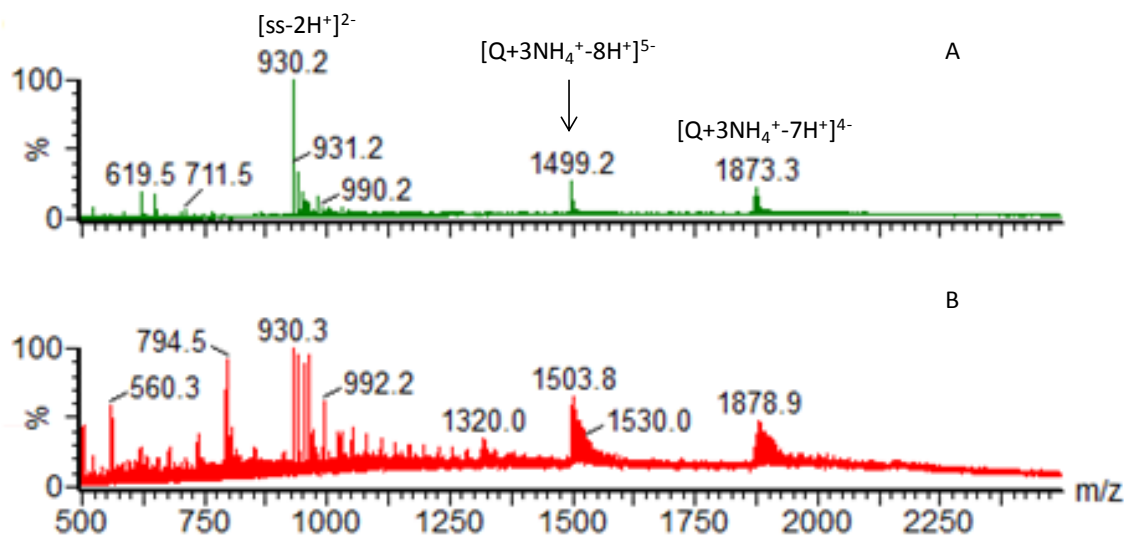


Figura 101 - Espectros de massa de: A - solução de quadruplex obtida após tratamento com resina; B - solução de quadruplex analisada directamente

A utilização da resina tornava o processo de obtenção das estruturas de G-quadruplex moroso e implicava um elevado grau de manipulação da amostra (1 hora de incubação da amostra dissolvida em água com a resina, seguida de evaporação da água usada em “speedvack” durante 2.30 h e posterior re-dissolução da amostra em tampão de acetato de amónio), por isso houve necessidade de recorrer a outro fornecedor e encomendar novos oligonucleotídeos.

Estes oligonucleotídeos foram testados, nas condições optimizadas anteriormente, e foram então finalmente encontradas as condições operacionais que permitiram a obtenção de espectros com os sinais correspondentes ao G-quadruplex mais intensos e mais bem resolvidos, sem recurso à utilização de resina (figura 102).

Na figura 102 são apresentados os espectros de massa obtidos para as soluções dos novos oligonucleotídeos e para solução de quadruplex obtida após tratamento com resina. Concluimos que provavelmente, as amostras inicialmente testadas continham a cadeia simples numa concentração inferior à desejada e encomendada.

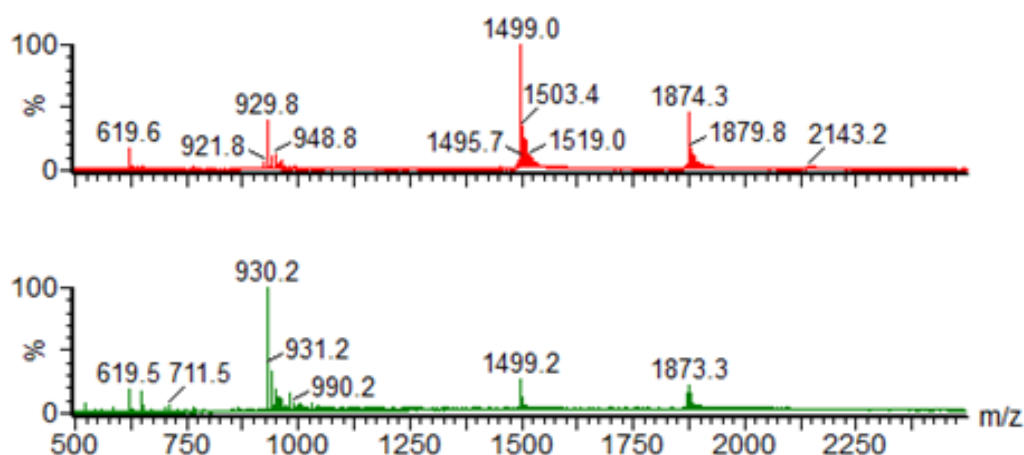


Figura 102 - Espectros de massa de: A - solução do novo oligonucleotídeo;
B - solução de quadruplex obtida após tratamento com resina

As condições finais otimizadas para a formação de Q1 foram as seguintes:

Concentração de acetato de amônio – 0.5 M

Fluxo de introdução de amostra – 10 $\mu\text{l min}^{-1}$

Temperatura de aquecimento – 85 °C

Tempo de aquecimento – 45 min

Temperatura de arrefecimento – 4 °C

Tempo de arrefecimento – “overnight”

Proporção oligonucleotídeo-metanol (v/v): 1: 3 (análise após 1 h de repouso pós adição do metanol)

Foram então analisadas, nas condições otimizadas, as soluções mistas quadruplex-porfirina. Na figura **103** é apresentado o espectro obtido para a solução do quadruplex Q1 com a porfirina **4** (duas cargas positivas).

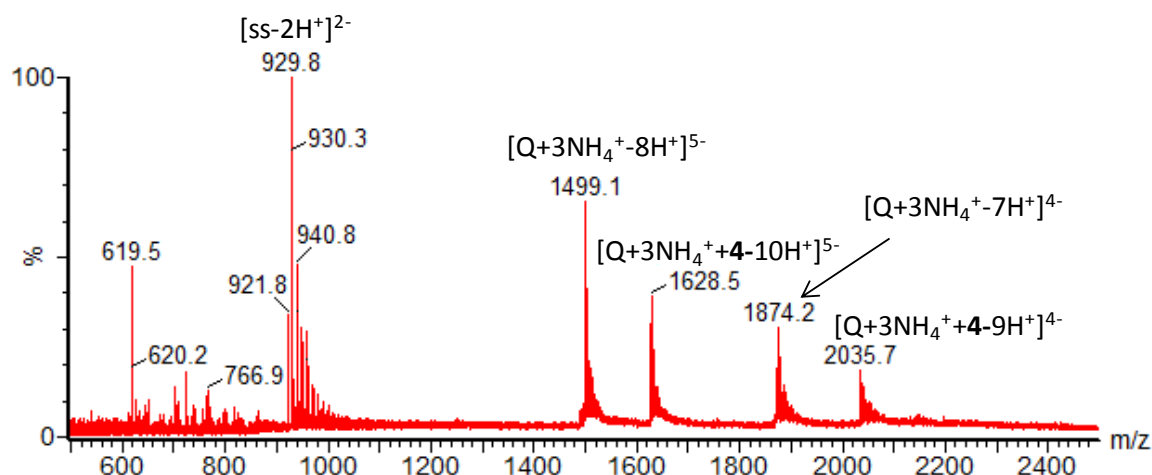


Figura 103 - Espectro de massa obtido para a solução de Q1 com a porfirina **4**

Todos os estudos com os outros quadruplexes foram feitos nas condições otimizadas para Q1 para que os resultados fossem comparáveis.

Nos espectros de massa de $[d(T_2AG_3)]_4$ a intensidade dos sinais obtidos era relativamente baixa, principalmente quando comparada com as intensidades dos sinais equivalentes obtidos para os oligonucleotídeos Q1 e Q2. Esta situação pode estar relacionada com a composição da cadeia simples correspondente, $d(T_2AG_3)$, que contém apenas três guaninas (o quadruplex correspondente tem apenas três quartetos). Na figura **104** são apresentados os espectros de massa obtidos para os três quadruplexes referidos.

Apesar da baixa intensidade dos sinais observados, foram efectuados os estudos de interação deste oligonucleotídeo e algumas das porfirinas seleccionadas, nomeadamente as porfirinas **1**, **4**, **9** e **14** a **18** com cargas variáveis entre 1 e 4.

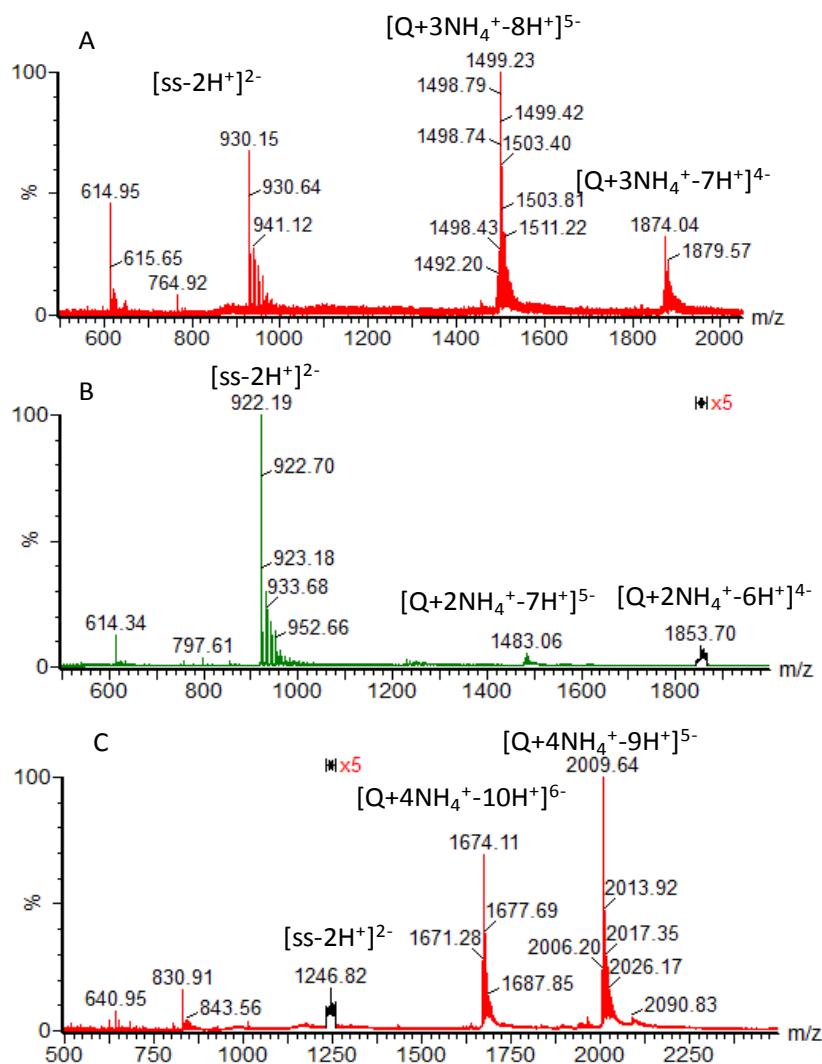


Figura 104 - Espectros de massa dos oligonucleotídeos: A - TG₄T; B - T₂AG₃; C - T₂G₅T

Como esperado, a intensidade dos sinais correspondentes aos aductos quadruplex-porfirina foi, de uma forma geral, baixa para todas as porfirinas. No entanto, verificou-se que, embora baixa, a intensidade dos sinais aumentava com o número de cargas das porfirinas.

Foram então obtidos os espectros de iões-produto para todos os aductos mas, mesmo para os aductos com as porfirinas com maior número de cargas, as intensidades dos sinais eram muito baixas. A maior parte dos espectros apresentava um ruído bastante elevado pelo que os estudos de interacção com este oligonucleotídeo foram abandonados.

Relativamente ao oligonucleotídeo contendo 12 bases, TTTTGGGGTTTT ou T₄G₄T₄, nas condições optimizadas para os outros oligonucleotídeos e dentro dos limites operacionais de *m/z* do Q-ToF, não se observaram sinais satisfatórios para as soluções do quadruplex na ausência de porfirina. Assim, e tendo em consideração que todos os oligonucleotídeos deveriam ser analisados nas mesmas condições experimentais, os estudos deste oligonucleotídeo com as várias porfirinas foram também abandonados.

5.4.1.2 - *Otimização dos parâmetros instrumentais*

Para as diferentes condições apresentadas anteriormente foi também feita a otimização dos parâmetros instrumentais do espectrômetro de massa. As condições testadas são apresentadas na tabela **15**.

Tabela 15 - Condições instrumentais testadas

Condições instrumentais Q-ToF		
Voltagem do cone (V)	MCP	Temperatura de dessolvatação (°C)
15	2100	150
	2200	180
20	2100	120
	2200	150
	2200	180
25	2100 2200	150
30	2100	150
	2200	120
		150
35	2200	180
		150
		120
40	2200	150

Os parâmetros finais otimizados foram:

Voltagem do cone – 20 V

Temperatura da fonte – 80 °C

Temperatura de dessolvatação – 120 °C

MCP - 2200

5.4.2 - *Otimização das condições operacionais na trapa de iões*

Na tentativa de conseguir uma caracterização mais aprofundada dos aductos formados e tendo como base condições experimentais referidas por outros autores,^{18,39} foram também efectuados estudos da interacção quadruplex-porfirina na trapa de iões, uma vez que este aparelho permite estudar fragmentações consecutivas (MS^n , com $n > 2$).

Foram obtidos, com sucesso, os espectros de massa das soluções dos quadruplexes. Na figura **105** é apresentado o espectro de massa obtido para a amostra contendo o quadruplex Q1. É possível identificar neste espectro os iões com m/z 1499.50 e 1874.50, respectivamente, $[Q1+3NH_4^+-8H^+]^{5-}$ e $[Q1+3NH_4^+-7H^+]^{4-}$ com abundâncias relativas consideráveis.

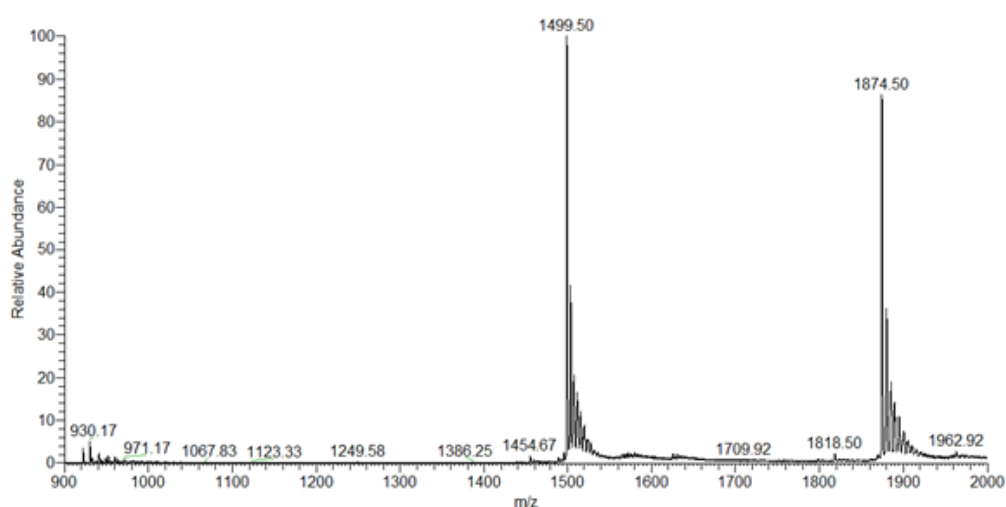


Figura 105 - Espectro de massa do oligonucleotídeo TG₄T

Quando foram adquiridos os espectros de massa das soluções mistas quadruplex-porfirina, os sinais dos aductos quadruplex-porfirina, apesar de estarem presentes, não apresentavam uma intensidade elevada. Na figura **106** mostra-se, como exemplo, o espectro de Q1 com a porfirina **9**. Além dos sinais presentes no espectro anterior, podem-se identificar os iões com m/z 1625.55 e 2039.27, respectivamente $[Q1+3NH_4^++9-11H^+]^{5-}$ e $[Q1+3NH_4^++9-10H^+]^{4-}$.

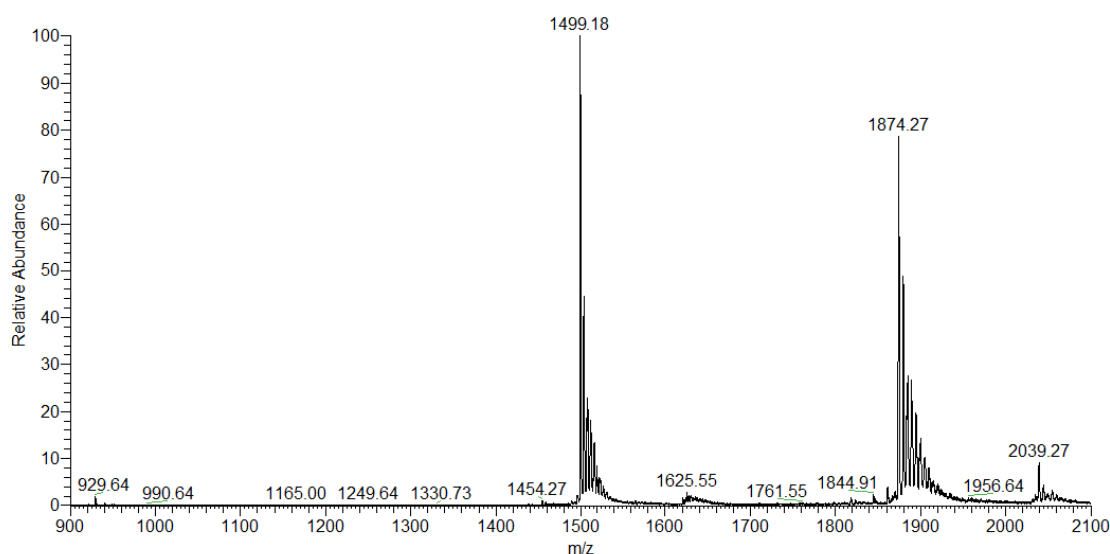


Figura 106 - Espectro obtido para o oligonucleotídeo Q1 e a porfirina **9**

Na trapa de iões o intervalo de massas a analisar no espectro de iões-produto é estabelecido automaticamente pelo aparelho sem que o operador o possa alterar. Desta forma, a aquisição dos espectros de iões-produto fica restringida a esse intervalo de massas. Este facto tornou a análise dos espectros limitativa, uma vez que alguns dos valores de m/z de iões-produto observados, quando a amostra foi analisada no Q-ToF, estão fora deste intervalo. Na figura **107**, como exemplo, é apresentado o espectro de iões-produto correspondente ao aducto $[Q1+3NH_4^++9-10H^+]^{4-}$. Como pode ser observado, não é possível verificar se o fragmento $[T1+9-6H^+]^{3-}$, m/z 2099, se formou uma vez que a sua razão massa/carga se encontra fora do intervalo de massas permitido.

O facto da abundância relativa dos iões correspondentes aos aductos oligonucleotídeo-porfirina ser baixa e de não ser possível pré-estabelecer, nas

experiências de íões-produto, o intervalo de m/z no qual se pretende fazer a aquisição, levou-nos a abandonar esta técnica.

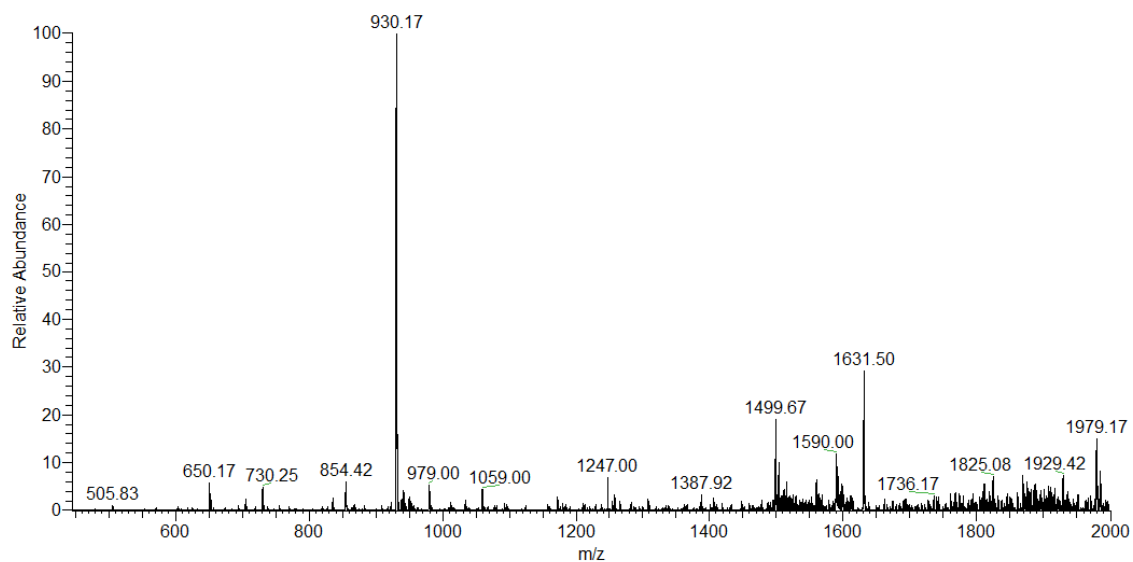


Figura 107 - Espectro de íões-produto do aducto $[Qs+3NH_4^+ + 9-10H^+]^{4-}$

5.5 - Procedimentos experimentais e instrumentação usada

As porfirinas usadas foram sintetizadas e caracterizadas⁴⁰ usando métodos já anteriormente descritos.^{41,42} As cadeias simples de oligonucleotídeos foram adquiridas com a pureza proveniente de separação por HPLC e concentração inicial de 100 μ M. (Eurogentec, Bélgica e VWR, Portugal).

As estruturas dos G-quadruplexes foram formadas a partir de soluções 100 μ M das cadeias simples, diluídas em acetato de amónio 0.5 M e aquecidas a 85 °C durante 45 minutos e mantidas em repouso, a 4 °C durante a noite. Foram então adicionadas às soluções anteriores, soluções 10^{-6} M, em metanol, das diferentes porfirinas em proporções oligonucleotídeo-porfirina de 1:3 em volume.

5.5.1 - Estudos realizados no espectrómetro de massa Q-ToF

Os espectros de massa foram obtidos, no modo de iões negativos, num aparelho Q-ToF 2 (Micromass, Reino Unido), equipado com uma fonte Z-spray, uma sonda de Electrospray e uma bomba de seringa. As temperaturas da fonte e a temperatura de dessolvatação usadas foram, respectivamente, 80°C e 150 °C. A voltagem do capilar foi de 2600 V e a resolução nominal foi de 9000. Foram usadas voltagens de cone compreendidas entre 30 e 50 V, tendo sido usado, principalmente, o valor 20 V. Usaram-se como gases de colisão e de nebulização respectivamente Ar e N₂. O fluxo de introdução foi de 10 μ l min⁻¹.

Os aductos foram formados por eElectrospray usando o espectrómetro de massa atrás referido e caracterizados por MS/MS (colisões de baixa energia). As experiências de MS/MS foram realizadas utilizando o quadrupolo para seleccionar os iões de interesse e o hexapolo como célula de colisões, com energias de colisão que variaram entre 20 e 55 eV.

5.5.2 - Estudos realizados na trapa de iões

Os espectros de massa foram obtidos, no modo de iões negativos, num aparelho Finnigan LXQ ion trap (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA). A voltagem usada na fonte foi de 4,99 kV, a temperatura e a voltagem do capilar foram 350 ° C e 1 V, respectivamente, a voltagem da lente tubular/cone (tube lens/skimmer) foi de 40 V, a pressão do gás de nebulização (N₂) de 30 psi e o fluxo de introdução da amostra de 8 µl min⁻¹. Foi usado como gás de colisões o He. Os espectros correspondentes a várias etapas de fragmentação, MSⁿ, foram adquiridos através da selecção e excitação de iões específicos, usando procedimentos padrão.

Bibliografia

- ¹ Lewis GN. *Chemical Catalog Co.* New York. **1923**; 109
- ² Van der Waals JD. Dissertação Doutoral. Leiden. **1873**
- ³ Ganem B, Li YT, Henion JD. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**; 113: 6294
- ⁴ Hofstadler SA, Griffey RH. *Chem Rev.* **2001**; 101: 377
- ⁵ Goodlett DR, Camp DG, Hardin CC, Corregan M, Smith RD. *Biol. Mass Spectrom.* **1993**; 22: 181
- ⁶ Rosu F, Gabelica V, Houssier C, Colson P, De Pauw E. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**; 16: 1729
- ⁷ Gabelica V, Rosu F, Witt M, Baykut G, De Pauw E. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**; 19: 201
- ⁸ Baker ES, Bernstein SL, Bowers MT. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**; 16: 989
- ⁹ Mazzitelli CL, Wang J, Smith S, Brodbelt JS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**; 18: 1760
- ¹⁰ Yuan G, Zhang Q, Zhou J, Li H. *Mass Spec.Rev.* **2011**; 30(6): 1121 e referências neste inseridas
- ¹¹ Rosu F, Gabelica V, Poncelet H, De Pauw E. *Nucleic Acids Res.* **2010**; 38: 5217
- ¹² David WM, Brodbelt J, Kerwin SM, Thomas PW. *Anal. Chem.* **2002**; 74: 2029

- ¹³ Carrasco C, Rosu F, Gabelica V, Houssier C, De Pauw E, Garbay-Jaureguiberry C, Roques B, Wilson WD, Chaires JB, Waring MJ, Bailly C. *Chem. Bio. Chem.* **2002** ; 3 : 1235
- ¹⁴ Rosu F, De Pauw E, Guittat L, Alberti P, Lacroix L, Mailliet P, Riou J-F, Mergny J-L. *Biochemistry.* **2003**; 42: 10361
- ¹⁵ Rosu F, Gabelica V, Shin-ya K, E. De Pauw. *Chem. Commun.* **2003**: 2702
- ¹⁶ Li W, Zhang M, Zhang J-l, Li H-q, Zhang X-c, Sun Q, Qiu C-m. *FEBS Letters.* **2006**; 580: 4905
- ¹⁷ Baker ES, Lee JT, Sessler JL, Bowers MT. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**; 128: 2641
- ¹⁸ Zhou J, Yuan G. *Chem. Eur. J.* **2007**; 13: 5018
- ¹⁹ Gornall KC, Samosom S, Talib J, Bremner JB, Beck JL. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**; 21: 1759
- ²⁰ Collie G, Reszka AP, Haider SM, Gabelica V, Parkinson GN, Neidle S. *Chem. Commun.* **2009**; 7482
- ²¹ Casagrande V, Alvino A, Bianco A, Ortaggi G, Franceschin M. *J. Mass. Spectrom.* **2009**; 44: 530
- ²² Linder J, Garner TP, Williams HEL, Searle MS, Moody CJ. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**; 133: 1044
- ²³ Nagesh N, Chatterji D. *J. Biochem. Biophys. Methods* **1995**; 30: 1
- ²⁴ Hud NV, Schultze P, Feigon J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**; 120: 6403

- ²⁵ Hud NV, Schultze P, Sklenar V, Feigon J. *J. Mol. Biol.* **1999**; 1: 233
- ²⁶ Wyttenbach T, Bowers MT. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**; 58: 511
- ²⁷ Brodbelt JS. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2010**; 3: 67
- ²⁸ Rueda M, Luque FJ, Orozco M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**; 128: 3608
- ²⁹ Izbicka E, Wheelhouse RT, Raymond E, Davidson KK, Lawrence RA, Sun D, Windle BE, Hurley LH, Von Hoff DD. *Cancer Res.* **1999**; 59: 639
- ³⁰ Gabelica V, Baker ES, Teulade-Fichou M-P, De Pauw E, Bowers MT. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**; 129: 895
- ³¹ Ramos CIV, Barros CM, Fernandes AM, Santana-Marques MG, Ferrer Correia AJ, Tomé JPC, Carrilho MCT, Faustino MAF, Tomé AC, Neves MGPMS, Cavaleiro JAS. *J. Mass Spectrom.* **2005**; 40: 1439
- ³² Ramos CIV, Santana-Marques MG. *J. Porphyrins Phthalocyanines.* **2009**; 13: 518
- ³³ Shi D-F, Wheelhouse RT, Sun D, Hurley LH. *J. Med. Chem.* **2001**; 44: 4509
- ³⁴ Vairamani M, Gross ML. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**; 125: 42
- ³⁵ Baker ES, Bernstein SL, Gabelica V, De Pauw E, Bowers MT. *Int. J. Mass Spectrom.* **2006**; 253: 225
- ³⁶ Tabata M, Nishimoto J. *The Porphyrin Handbook*, Vol. 9, Database of redox potentials and binding constants. Ed. Kadish KM, Smith KM, Guillard R. Academic Press. **2000**; 221

³⁷ Hambright P, Fleischer EB. *Inorg. Chem.* **1970**; 9: 1757

³⁸ Cheng X, Liu X, Bing T, Cao Z, Shangguan D. *Biochemistry.* **2009**; 48: 7817

³⁹ Li H, Yuan G, Du D. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**; 19: 550

⁴⁰ Tomé JPC. *Dissertação de doutoramento.* Universidade de Aveiro. **2001**

⁴¹ Driaf K, Granet R, Krausz P, Kaouadji M, Thomasson F, Chulia AJ, Verneuil B, Spiro M, Blais J-C, Bolbach G. "Synthesis of glycosylated cationic porphyrins as potencial agents in photodynamic therapy". *Canadian Journal of Chemistry.* 1996; **74**: 1550

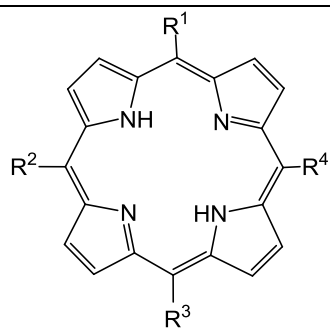
⁴² Gonsalves AMd'AR, Varejão JMTB, Pereira MM. *J. Heterocyclic Chem.* **1991**; 28: 635

ANEXO 1.

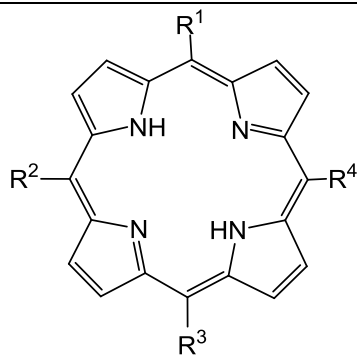
NOMENCLATURA IUPAC, MASSAS MONOISOTÓPICAS E FÓRMULAS ELEMENTARES DAS PORFIRINAS ESTUDADAS

Porfirina	Nomenclatura IUPAC
1	Iodeto de 5-(<i>N</i> -metilpiridínio-4-il)-10,15,20-fenilporfirina
2	Iodeto de 5-(<i>N</i> -metilpiridínio-4-il)-10,15,20-(2,3,6-trifluorofenil)porfirina
3	Iodeto de 5-(<i>N</i> -metilpiridínio-4-il)-10,15,20-pentafluorofenilporfirina
4	Diiodeto de 5,10-bis(<i>N</i> -metilpiridínio-4-il)-15,20-fenilporfirina
5	Diiodeto de 5,10-bis(<i>N</i> -metilpiridínio-4-il)-15,20-(2,3,6-trifluorofenil)porfirina
6	Diiodeto de 5,15-bis(<i>N</i> -metilpiridínio-4-il)-10,20-(2,3,6-trifluorofenil)porfirina
7	Diiodeto de 5,10-bis(<i>N</i> -metilpiridínio-4-il)-15,20-pentafluorofenilporfirina
8	Diiodeto de 5,15-bis(<i>N</i> -metilpiridínio-4-il)-10,20-pentafluorofenilporfirina
9	Triiodeto de 5,10,15-tris(<i>N</i> -metilpiridínio-4-il)-20-fenilporfirina
10	Triiodeto de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(<i>N</i> -metilpiridínio-4-il)porfirina
11	Triiodeto de 5,10,15-tris(<i>N</i> -metilpiridínio-4-il)-20-(2,3,6-trifluorofenil)porfirina
12	Triiodeto de 5-(4-metoxycarbonilfenil)-10,15,20- <i>tris</i> (<i>N</i> -metilpiridínio-4-il)porfirina
13	Triiodeto de 5,10,15-tris(<i>N</i> -metilpiridínio-4-il)-20-pentafluorofenilporfirina
14	Tetraiodeto / Tetra(<i>p</i> -toluenosulfonato) de 5,10,15,20-tetraquis(<i>N</i> -metilpiridínio-4-il)porfirina
15	Tetrabrometo de 5,10,15,20-tetraquis(<i>N</i> -etilpiridínio-4-il)porfirina
16	Tetraiodeto de 5,10,15,20-tetraquis(<i>N</i> -pentilpiridínio-4-il)porfirina
17	Tetrabrometo de 5,10,15,20-tetraquis(<i>N</i> -dodecilpiridínio-4-il)porfirina
18	Tetra(<i>p</i> -toluenosulfonato) de 5,10,15,20-tetraquis(4-trimetilamoniofenil)porfirina
19	5,10,15,20-tetraquis(4-piridil)porfirina

Porfirina	Carga (p)	Massa monoisotópica	Fórmula elementar
1	+ 1	630.26	$C_{44}H_{32}N_5$
2	+ 1	792.12	$C_{44}H_{23}N_5F_9$
3	+ 1	900.12	$C_{44}H_{17}N_5F_{15}$
4	+ 2	646.28	$C_{44}H_{34}N_6$
5	+ 2	754.23	$C_{44}H_{28}N_6F_6$
6	+ 2	754.23	$C_{44}H_{28}N_6F_6$
7	+ 2	826.20	$C_{44}H_{24}N_6F_{10}$
8	+ 2	826.20	$C_{44}H_{24}N_6F_{10}$
9	+ 3	662.30	$C_{44}H_{36}N_7$
10	+ 3	706.29	$C_{45}H_{36}N_7O_2$
11	+ 3	716.26	$C_{44}H_{33}N_7F_3$
12	+ 3	720.31	$C_{46}H_{38}N_7O_2$
13	+ 3	752.26	$C_{44}H_{31}N_7F_5$
14	+ 4	678.32	$C_{44}H_{38}N_8$
15	+ 4	734.38	$C_{48}H_{46}N_8$
16	+ 4	902.57	$C_{60}H_{70}N_8$
17	+ 4	1295.01	$C_{88}H_{126}N_8$
18	+ 4	846.51	$C_{56}H_{62}N_8$
19	0	618.32	$C_{40}H_{26}N_8$



Porfirina	Substituintes			
	¹ R	² R	³ R	⁴ R
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				



Porfirina	Substituintes			
	¹ R	² R	³ R	⁴ R
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				

ANEXO 2.

OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA O OLIGONUCLEOTÍDEO TG₄T (Q1)

Condições testadas para o oligonucleotídeo TG₄T

			Condições testadas					
Concentração de CH ₃ CO ₂ NH ₄	Resina *	Fluxo de Introdução (μl.min ⁻¹)	Aquecimento		Arrefecimento		Observações	
			T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo		
0.50 M	Não	5	85	45'	4	1 h	análise directa	
0.75 M			90			16 h	1h repouso antes análise	
1.00 M		10	85	45'	4	1 h	análise directa	
			90			"overnight"	1h repouso antes análise	
0.50 M 0.75 M 1.00 M	Sim	5	85 90 100	45'	ambiente	"overnight"	análise directa	
					4	1 h	1 h repouso antes análise	
						5 h	análise directa	
							16 h	5 h repouso antes análise
								"overnight"
								antes análise
		10	85 90 100	45'	ambiente	"overnight"	análise directa	
					4	1 h	1h repouso antes análise	
						5 h	análise directa	
							16 h	5 h repouso antes análise
								"overnight"
								antes análise

* - (adição da resina à solução contendo o oligonucleotídeo durante 1 h, seguida de colocação numa "speedvack" durante aproximadamente 2.30h até atingir a secura

ANEXO 3.

*TABELAS UTILIZADAS PARA PREVISÃO
DE POSSÍVEIS IÕES PARA O
G-QUADRUPLEX TG_4T (Q1)*

Q1 - iões na ausência de porfirinas

ss (TG ₄ T)	1862.34	—→	C ₆₀ H ₇₅ N ₂₄ O ₃₆ P ₅			
ds (TG ₄ T)	3724.68		C ₁₂₀ H ₁₅₀ N ₄₈ O ₇₂ P ₁₀			
ts (TG ₄ T)	5587.02		C ₁₈₀ H ₂₂₅ N ₇₂ O ₁₀₈ P ₁₅			
qs (TG ₄ T)	7449.36		C ₂₄₀ H ₃₀₀ N ₉₆ O ₁₄₄ P ₂₀			
Razão massa / carga (m/z)						
[ss (TG ₄ T)] ^{z-}	930.17	619.78	464.585	371.47	309.39	265.05
[ds (TG ₄ T)] ^{z-}	1861.34	1240.56	930.17	743.94	619.78	531.10
[ts (TG ₄ T)] ^{z-}	2792.51	1861.34	1395.76	1116.40	930.17	797.14
[qs (TG ₄ T)] ^{z-}	3723.68	2482.12	1861.34	1488.87	1240.56	1063.19
carga (z)	-2	-3	-4	-5	-6	-7
[qs (TG ₄ T) + NH ₄ ⁺] ^{z-}	3732.68	2488.12	1865.84	1492.47	1243.56	1065.77
[qs (TG ₄ T) + 2 NH ₄ ⁺] ^{z-}	3741.68	2494.12	1870.34	1496.07	1246.56	1068.33
[qs (TG ₄ T) + 3 NH ₄ ⁺] ^{z-}	3750.68	2500.12	1874.84	1499.17	1249.56	1070.91

Cadeia simples - **ss**

Cadeia tripla - **ts**

Cadeia dupla - **ds**

Quadruplex - **qs**

Nas tabelas apresentadas a carga negativa global (z) é o resultado do balanço entre as cargas negativas devidas à desprotonação e as cargas positivas (iões amónio e/ou porfirinas).

Nestas tabelas, ao contrário do que foi feito no capítulo 5, foram omitidos os protões perdidos, no entanto o cálculo das razões massa / carga foi feito entrando em conta com esse factor.

**Q1 - iões na presença de porfirinas e de iões NH₄⁺-
porfirinas 1, 4, 9 e 14**

carga (z)	-2	-3	-4	-5	-6
	Razão massa / carga (m/z)				
[ss + 3 NH ₄ ⁺ + 1] ^{z-}	1271.80	847.53	635.40	508.12	423.27
[ss + 3 NH ₄ ⁺ + 4] ^{z-}	1279.31	852.54	639.16	511.12	425.77
[ss + 3 NH ₄ ⁺ + 9] ^{z-}	1286.82	857.55	642.91	514.13	428.27
[ss + 3 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	1294.33	862.55	646.67	517.13	430.78
[ds + 3 NH ₄ ⁺ + 1] ^{z-}	2202.97	1468.31	1100.99	880.59	733.66
[ds + 3 NH ₄ ⁺ + 4] ^{z-}	2210.48	1473.32	1104.74	883.59	736.16
[ds + 3 NH ₄ ⁺ + 9] ^{z-}	2217.99	1478.33	1108.50	886.60	738.66
[ds + 3 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	2225.50	1483.33	1112.25	889.60	741.17
[ts + 3 NH ₄ ⁺ + 1] ^{z-}	3134.14	2089.09	1566.57	1253.06	1044.05
[ts + 3 NH ₄ ⁺ + 4] ^{z-}	3141.65	2094.10	1570.33	1256.06	1046.55
[ts + 3 NH ₄ ⁺ + 9] ^{z-}	3149.16	2099.11	1574.08	1259.06	1049.05
[ts + 3 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	3156.67	2104.11	1577.84	1262.07	1051.56
[qs + 3 NH ₄ ⁺ + 1] ^{z-}	4065.31	2709.87	2032.16	1625.52	1354.44
[qs + 3 NH ₄ ⁺ + 4] ^{z-}	4072.82	2714.88	2035.91	1628.53	1356.94
[qs + 3 NH ₄ ⁺ + 9] ^{z-}	4080.33	2719.89	2039.67	1631.53	1359.44
[qs + 3 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	4087.84	2724.89	2043.42	1634.54	1361.95

**Q1 - iões na presença de porfirinas e de iões NH₄⁺ -
porfirinas 14 a 19**

carga (z)	-2	-3	-4	-5	-6
	Razão massa / carga (m/z)				
[ss + 3 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	1292.83	861.55	645.92	516.53	430.28
[ss + 3 NH ₄ ⁺ + 15] ^{z-}	1320.86	880.24	659.93	527.74	439.62
[ss + 3 NH ₄ ⁺ + 16] ^{z-}	1404.96	936.30	701.98	561.38	467.65
[ss + 3 NH ₄ ⁺ + 17] ^{z-}	1601.18	1067.12	800.09	639.87	533.06
[ss + 3 NH ₄ ⁺ + 18] ^{z-}	1376.93	917.62	687.96	550.17	458.31
[ss + 3 NH ₄ ⁺ + 19] ^{z-}	1264.33	842.55	631.67	505.13	420.78
[ds + 3 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	2224.00	1482.33	1111.50	889.00	740.67
[ds + 3 NH ₄ ⁺ + 15] ^{z-}	2252.03	1501.02	1125.52	900.21	750.01
[ds + 3 NH ₄ ⁺ + 16] ^{z-}	2336.13	1557.08	1167.56	933.85	778.04
[ds + 3 NH ₄ ⁺ + 17] ^{z-}	2532.35	1687.90	1265.67	1012.34	843.45
[ds + 3 NH ₄ ⁺ + 18] ^{z-}	2308.10	1538.40	1153.55	922.64	768.70
[ds + 3 NH ₄ ⁺ + 19] ^{z-}	2193.97	1462.31	1096.49	876.99	730.66
[ts + 3 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	3155.17	2103.11	1577.09	1261.47	1051.06
[ts + 3 NH ₄ ⁺ + 15] ^{z-}	3183.20	2121.80	1591.10	1272.68	1060.40
[ts + 3 NH ₄ ⁺ + 16] ^{z-}	3267.30	2177.86	1633.15	1306.32	1088.43
[ts + 3 NH ₄ ⁺ + 17] ^{z-}	3463.52	2308.68	1731.26	1384.81	1153.84
[ts + 3 NH ₄ ⁺ + 18] ^{z-}	3239.27	2159.18	1619.13	1295.11	1079.09
[ts + 3 NH ₄ ⁺ + 19] ^{z-}	3126.67	2084.11	1562.84	1250.07	1041.56
[qs + 3 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	4086.34	2723.89	2042.67	1633.94	1361.45
[qs + 3 NH ₄ ⁺ + 15] ^{z-}	4114.37	2742.58	2056.69	1645.15	1370.79
[qs + 3 NH ₄ ⁺ + 16] ^{z-}	4198.47	2798.64	2098.73	1678.79	1398.82
[qs + 3 NH ₄ ⁺ + 17] ^{z-}	4369.19	2912.46	2184.09	1747.07	1455.73
[qs + 3 NH ₄ ⁺ + 18] ^{z-}	4170.44	2779.96	2084.72	1667.57	1389.48
[qs + 3 NH ₄ ⁺ + 19] ^{z-}	4057.84	2704.89	2028.42	1622.54	1351.95

**Q1 - iões na presença de porfirinas e de iões NH₄⁺ -
porfirinas 2, 3, 5 a 8, 11 e 13**

carga (z)	-2	-3	-4	-5	-6
	Razão massa / carga (m/z)				
[ss + 3 NH ₄ ⁺ + 2] ^{z-}	1353.23	901.82	676.12	540.69	450.41
[ss + 3 NH ₄ ⁺ + 3] ^{z-}	1405.23	936.49	702.12	561.49	467.74
[ss + 3 NH ₄ ⁺ + 5 / 6] ^{z-}	1331.77	887.51	665.38	532.11	443.26
[ss + 3 NH ₄ ⁺ + 7 / 8] ^{z-}	1367.77	911.51	683.38	546.51	455.26
[ss + 3 NH ₄ ⁺ + 11] ^{z-}	1312.30	874.53	655.65	524.32	436.77
[ss + 3 NH ₄ ⁺ + 13] ^{z-}	1330.30	886.53	664.65	531.52	442.77
[ds + 3 NH ₄ ⁺ + 2] ^{z-}	2284.40	1522.60	1141.70	913.16	760.80
[ds + 3 NH ₄ ⁺ + 3] ^{z-}	2336.40	1557.27	1167.70	933.96	778.13
[ds + 3 NH ₄ ⁺ + 5 / 6] ^{z-}	2262.94	1508.29	1130.97	904.57	753.65
[ds + 3 NH ₄ ⁺ + 7 / 8] ^{z-}	2298.94	1532.29	1148.97	918.97	765.65
[ds + 3 NH ₄ ⁺ + 11] ^{z-}	2243.47	1495.31	1121.24	896.79	747.16
[ds + 3 NH ₄ ⁺ + 13] ^{z-}	2261.47	1507.31	1130.24	903.99	753.16
[ts + 3 NH ₄ ⁺ + 2] ^{z-}	3215.57	2143.38	1607.29	1285.63	1071.19
[ts + 3 NH ₄ ⁺ + 3] ^{z-}	3267.57	2178.05	1633.29	1306.43	1088.52
[ts + 3 NH ₄ ⁺ + 5 / 6] ^{z-}	3194.11	2129.07	1596.55	1277.04	1064.04
[ts + 3 NH ₄ ⁺ + 7 / 8] ^{z-}	3230.11	2153.07	1614.55	1291.44	1076.04
[ts + 3 NH ₄ ⁺ + 11] ^{z-}	3174.64	2116.09	1586.82	1269.26	1057.55
[ts + 3 NH ₄ ⁺ + 13] ^{z-}	3192.64	2128.09	1595.82	1276.46	1063.55
[qs + 3 NH ₄ ⁺ + 2] ^{z-}	4146.74	2764.16	2072.87	1658.10	1381.58
[qs + 3 NH ₄ ⁺ + 3] ^{z-}	4198.74	2798.83	2098.87	1678.90	1398.91
[qs + 3 NH ₄ ⁺ + 5 / 6] ^{z-}	4125.28	2749.85	2062.14	1649.51	1374.43
[qs + 3 NH ₄ ⁺ + 7 / 8] ^{z-}	4161.28	2773.85	2080.14	1663.91	1386.43
[qs + 3 NH ₄ ⁺ + 11] ^{z-}	4105.81	2736.87	2052.41	1641.72	1367.94
[qs + 3 NH ₄ ⁺ + 13] ^{z-}	4123.81	2748.87	2061.41	1648.92	1373.94

Q1 - iões na presença de porfirinas e ausência de iões NH₄⁺ - porfirinas 1, 4, 9 e 14

carga (z)	-2	-3	-4	-5	-6
	Razão massa / carga (<i>m/z</i>)				
[ss + 1] ^{z-}	1244.80	829.53	621.90	497.32	414.27
[ss + 4] ^{z-}	1252.31	834.54	625.66	500.32	416.77
[ss + 9] ^{z-}	1259.82	839.55	629.41	503.33	419.27
[ss + 14] ^{z-}	1267.33	844.55	633.17	506.33	421.78
[ds + 1] ^{z-}	2175.97	1450.31	1087.49	869.79	724.66
[ds + 4] ^{z-}	2183.48	1455.32	1091.24	872.79	727.16
[ds + 9] ^{z-}	2190.99	1460.33	1095.00	875.80	729.66
[ds + 14] ^{z-}	2198.50	1465.33	1098.75	878.80	732.17
[ts + 1] ^{z-}	3107.14	2071.09	1553.07	1242.26	1035.05
[ts + 4] ^{z-}	3114.65	2076.10	1556.83	1245.26	1037.55
[ts + 9] ^{z-}	3122.16	2081.11	1560.58	1248.26	1040.05
[ts + 14] ^{z-}	3129.67	2086.11	1564.34	1251.27	1042.56
[qs + 1] ^{z-}	4038.31	2691.87	2018.66	1614.72	1345.44
[qs + 4] ^{z-}	4045.82	2696.88	2022.41	1617.73	1347.94
[qs + 9] ^{z-}	4053.33	2701.89	2026.17	1620.73	1350.44
[qs + 14] ^{z-}	4060.84	2706.89	2029.92	1623.74	1352.95

Q1 - iões na presença de porfirinas e ausência de iões NH₄⁺ - porfirinas 14 a 19

carga (z)	-2	-3	-4	-5	-6
	Razão massa / carga (m/z)				
[ss + 14] ^{z-}	1267.33	844.55	633.17	506.33	421.78
[ss + 15] ^{z-}	1295.36	863.24	647.18	517.54	431.12
[ss + 16] ^{z-}	1379.46	919.30	689.23	551.18	459.15
[ss + 17] ^{z-}	1575.68	1050.12	787.34	629.67	524.56
[ss + 18] ^{z-}	1351.43	900.62	675.21	539.97	449.81
[ss + 19] ^{z-}	1238.83	825.55	618.92	494.93	412.28
[ds + 14] ^{z-}	2200.50	1466.67	1099.75	879.60	732.83
[ds + 15] ^{z-}	2228.53	1485.35	1113.77	890.81	742.18
[ds + 16] ^{z-}	2312.63	1541.42	1155.81	924.45	770.21
[ds + 17] ^{z-}	2508.85	1672.23	1253.92	1002.94	835.62
[ds + 18] ^{z-}	2284.60	1522.73	1141.80	913.24	760.87
[ds + 19] ^{z-}	2168.47	1445.31	1083.74	866.79	722.16
[ts + 14] ^{z-}	3131.67	2087.45	1565.34	1252.07	1043.22
[ts + 15] ^{z-}	3159.70	2106.13	1579.35	1263.28	1052.57
[ts + 16] ^{z-}	3243.80	2162.20	1621.40	1296.92	1080.60
[ts + 17] ^{z-}	3440.02	2293.01	1719.51	1375.41	1146.01
[ts + 18] ^{z-}	3215.77	2143.51	1607.38	1285.71	1071.26
[ts + 19] ^{z-}	3101.17	2067.11	1550.09	1239.87	1033.06
[qs + 14] ^{z-}	4060.84	2706.89	2029.92	1623.74	1352.95
[qs + 15] ^{z-}	4088.87	2725.58	2043.94	1634.95	1362.29
[qs + 16] ^{z-}	4172.97	2781.64	2085.98	1668.59	1390.32
[qs + 17] ^{z-}	4369.19	2912.46	2184.09	1747.07	1455.73
[qs + 18] ^{z-}	4144.94	2762.96	2071.97	1657.37	1380.98
[qs + 19] ^{z-}	4032.34	2687.89	2015.67	1612.34	1343.45

Q1 - iões na presença de porfirinas e ausência de iões NH₄⁺ - porfirinas 2, 3, 5 a 8, 11 e 13

carga (z)	-2	-3	-4	-5	-6
	Razão massa / carga (m/z)				
[ss + 2] ^{z-}	1327.73	884.82	663.37	530.49	441.91
[ss 3] ^{z-}	1378.23	918.49	688.62	550.69	458.74
[ss + 5 / 6] ^{z-}	1306.27	870.51	652.63	521.91	434.76
[ss + 7 / 8] ^{z-}	1341.27	893.84	670.13	535.91	446.42
[ss + 11] ^{z-}	1286.80	857.53	642.90	514.12	428.27
[ss + 13] ^{z-}	1304.30	869.20	651.65	521.12	434.10
[ds + 2] ^{z-}	2259.40	1505.93	1129.20	903.16	752.47
[ds + 3] ^{z-}	2311.40	1540.60	1155.20	923.96	769.80
[ds + 5 / 6] ^{z-}	2238.44	1491.96	1118.72	894.77	745.48
[ds + 7 / 8] ^{z-}	2274.44	1515.96	1136.72	909.17	757.48
[ds + 11] ^{z-}	2219.47	1479.31	1109.24	887.19	739.16
[ds + 13] ^{z-}	2237.47	1491.31	1118.24	894.39	745.16
[ts + 2] ^{z-}	3190.57	2126.71	1594.79	1275.63	1062.86
[ts + 3] ^{z-}	3242.57	2161.38	1620.79	1296.43	1080.19
[ts + 5 / 6] ^{z-}	3169.61	2112.74	1584.30	1267.24	1055.87
[ts + 7 / 8] ^{z-}	3205.61	2136.74	1602.30	1281.64	1067.87
[ts + 11] ^{z-}	3150.64	2100.09	1574.82	1259.66	1049.55
[ts + 13] ^{z-}	3168.64	2112.09	1583.82	1266.86	1055.55
[qs + 2] ^{z-}	4121.24	2747.16	2060.12	1647.90	1373.08
[qs + 3] ^{z-}	4171.74	2780.83	2085.37	1668.10	1389.91
[qs + 5 / 6] ^{z-}	4099.78	2732.85	2049.39	1639.31	1365.93
[qs + 7 / 8] ^{z-}	4134.78	2756.18	2066.89	1653.31	1377.59
[qs + 11] ^{z-}	4080.31	2719.87	2039.66	1631.52	1359.44
[qs + 13] ^{z-}	4097.81	2731.54	2048.41	1638.52	1365.27

ANEXO 4.

*TABELAS UTILIZADAS PARA PREVISÃO
DE POSSÍVEIS IÕES PARA O
G-QUADRUPLEX T_2G_5T (Q2)*

Q2 - iões na ausência de porfirinas

ss (T ₂ G ₅ T)	2495.44	————→	C ₈₀ H ₁₀₀ N ₃₁ O ₄₉ P ₇			
ds (T ₂ G ₅ T)	4990.88		C ₁₆₀ H ₂₀₀ N ₆₂ O ₉₈ P ₁₄			
ts (T ₂ G ₅ T)	7486.32		C ₂₄₀ H ₃₀₀ N ₉₃ O ₁₄₇ P ₂₁			
qs (T ₂ G ₅ T)	9981.76		C ₃₂₀ H ₄₀₀ N ₁₂₄ O ₁₉₆ P ₂₈			
Razão massa / carga (m/z)						
[ss (T ₂ G ₅ T)] ^{z-}	1246.72	830.81	622.86	498.09	414.91	355.49
[ds (T ₂ G ₅ T)] ^{z-}	2494.44	1662.63	1246.72	997.18	830.813	711.98
[ts (T ₂ G ₅ T)] ^{z-}	3742.16	2494.44	1870.58	1496.26	1246.72	1068.47
[qs (T ₂ G ₅ T)] ^{z-}	4989.88	3326.25	2494.44	1995.35	1662.62	1424.96
carga (z)	2	3	4	5	6	7
[qs (T ₂ G ₅ T) + NH ₄ ⁺] ^{z-}	4998.38	3331.92	2498.69	1998.75	1665.46	1427.39
[qs (T ₂ G ₅ T) + 2 NH ₄ ⁺] ^{z-}	5006.88	3337.59	2502.94	2002.15	1668.29	1429.82
[qs (T ₂ G ₅ T) + 3 NH ₄ ⁺] ^{z-}	5015.38	3343.25	2507.19	2005.55	1671.13	1432.25
[qs (T ₂ G ₅ T) + 4 NH ₄ ⁺] ^{z-}	5023.88	3348.92	2511.44	2008.95	1673.96	1434.68

Cadeia simples - **ss**

Cadeia tripla - **ts**

Cadeia dupla - **ds**

Quadruplex – **qs**

Nas tabelas apresentadas a carga negativa global (z) é o resultado do balanço entre as cargas negativas devidas à desprotonação e as cargas positivas (iões amónio e/ou porfirinas).

Nestas tabelas, ao contrário do que foi feito no capítulo 5, foram omitidos os prótons perdidos, no entanto o cálculo das razões mass / carga foi feito entrando em conta com esse factor.

**Q2 - iões na presença de porfirinas e de iões NH₄⁺ -
porfirinas 1, 4, 9 e 14**

carga (z)	-2	-3	-4	-5	-6
	Razão massa / carga (m/z)				
[ss + 4 NH ₄ ⁺ + 1] ^{z-}	1597.35	1064.57	798.18	638.34	531.78
[ss + 4 NH ₄ ⁺ + 4] ^{z-}	1604.86	1069.57	801.93	641.34	534.29
[ss + 4 NH ₄ ⁺ + 9] ^{z-}	1612.37	1074.58	805.69	644.35	536.79
[ss + 4 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	1619.88	1079.59	809.44	647.35	539.29
[ds + 4 NH ₄ ⁺ + 1] ^{z-}	2845.07	1896.38	1422.04	1137.43	947.69
[ds + 4 NH ₄ ⁺ + 4] ^{z-}	2844.57	1896.05	1421.79	1137.23	947.52
[ds + 4 NH ₄ ⁺ + 9] ^{z-}	2844.07	1895.71	1421.54	1137.03	947.36
[ds + 4 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	2843.57	1895.38	1421.29	1136.83	947.19
[ts + 4 NH ₄ ⁺ + 1] ^{z-}	4092.79	2728.19	2045.90	1636.52	1363.60
[ts + 4 NH ₄ ⁺ + 4] ^{z-}	4100.30	2733.20	2049.65	1639.52	1366.10
[ts + 4 NH ₄ ⁺ + 9] ^{z-}	4107.81	2738.21	2053.41	1642.52	1368.60
[ts + 4 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	4115.32	2743.21	2057.16	1645.53	1371.11
[qs + 4 NH ₄ ⁺ + 1] ^{z-}	5340.51	3560.01	2669.76	2135.60	1779.50
[qs + 4 NH ₄ ⁺ + 4] ^{z-}	5348.02	3565.01	2673.51	2138.61	1782.01
[qs + 4 NH ₄ ⁺ + 9] ^{z-}	5355.53	3570.02	2677.27	2141.61	1784.51
[qs + 4 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	5363.04	3575.03	2681.02	2144.62	1787.01

**Q2 - iões na presença de porfirinas e de iões NH₄⁺ -
porfirinas 14 a 19**

carga (n)	-2	-3	-4	-5	-6
	Razão massa / carga (m/z)				
[ss + 4 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	1618.38	1078.59	808.69	646.75	538.79
[ss + 4 NH ₄ ⁺ + 15] ^{z-}	1646.41	1097.27	822.71	657.96	548.14
[ss + 4 NH ₄ ⁺ + 16] ^{z-}	1730.51	1153.34	864.75	691.60	576.17
[ss + 4 NH ₄ ⁺ + 17] ^{z-}	1926.73	1284.15	962.86	770.09	641.58
[ss + 4 NH ₄ ⁺ + 18] ^{z-}	1702.48	1134.65	850.74	680.39	566.83
[ss + 4 NH ₄ ⁺ + 19] ^{z-}	1591.38	1060.59	795.19	635.95	529.79
[ds + 4 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	2866.10	1910.40	1432.55	1145.84	954.70
[ds + 4 NH ₄ ⁺ + 15] ^{z-}	2894.13	1929.09	1446.57	1157.05	964.04
[ds + 4 NH ₄ ⁺ + 16] ^{z-}	2978.23	1985.15	1488.61	1190.69	992.08
[ds + 4 NH ₄ ⁺ + 17] ^{z-}	3174.45	2115.96	1586.72	1269.18	1057.48
[ds + 4 NH ₄ ⁺ + 18] ^{z-}	2950.20	1966.46	1474.60	1179.48	982.73
[ds + 4 NH ₄ ⁺ + 19] ^{z-}	2837.57	1891.38	1418.29	1134.43	945.19
[ts + 4 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	4113.82	2742.21	2056.41	1644.93	1370.61
[ts + 4 NH ₄ ⁺ + 15] ^{z-}	4141.85	2760.90	2070.43	1656.14	1379.95
[ts + 4 NH ₄ ⁺ + 16] ^{z-}	4225.95	2816.96	2112.47	1689.78	1407.98
[ts + 4 NH ₄ ⁺ + 17] ^{z-}	4422.17	2947.78	2210.58	1768.27	1473.39
[ts + 4 NH ₄ ⁺ + 18] ^{z-}	4197.92	2798.28	2098.46	1678.57	1398.64
[ts + 4 NH ₄ ⁺ + 19] ^{z-}	4086.82	2724.21	2042.91	1634.13	1361.61
[qs + 4 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	5361.54	3574.03	2680.27	2144.02	1786.51
[qs + 4 NH ₄ ⁺ + 15] ^{z-}	5389.57	3592.71	2694.29	2155.23	1795.86
[qs + 4 NH ₄ ⁺ + 16] ^{z-}	5473.67	3648.78	2736.33	2188.87	1823.89
[qs + 4 NH ₄ ⁺ + 17] ^{z-}	5669.89	3779.59	2834.44	2267.35	1889.30
[qs + 4 NH ₄ ⁺ + 18] ^{z-}	5445.64	3630.09	2722.32	2177.65	1814.55
[qs + 4 NH ₄ ⁺ + 19] ^{z-}	5334.54	3556.03	2666.77	2133.22	1777.51

**Q2 - iões na presença de porfirinas e de iões NH₄⁺ -
porfirinas 2, 3, 5 a 8, 11 e 13**

carga (n)	-2	-3	-4	-5	-6
	Razão massa / carga (<i>m/z</i>)				
[ss + 4 NH ₄ ⁺ + 2] ^{z-}	1678.78	1118.85	838.89	670.91	558.93
[ss + 4 NH ₄ ⁺ + 3] ^{z-}	1730.78	1153.52	864.89	691.71	576.26
[ss + 4 NH ₄ ⁺ + 5 / 6] ^{z-}	1657.32	1104.54	828.16	662.33	551.77
[ss + 4 NH ₄ ⁺ + 7 / 8] ^{z-}	1693.32	1128.54	846.16	676.73	563.77
[ss + 4 NH ₄ ⁺ + 11] ^{z-}	1637.85	1091.57	818.43	654.54	545.28
[ss + 4 NH ₄ ⁺ + 13] ^{z-}	1655.85	1103.57	827.43	661.74	551.28
[ds + 4 NH ₄ ⁺ + 2] ^{z-}	2926.50	1950.67	1462.75	1170.00	974.83
[ds + 4 NH ₄ ⁺ + 3] ^{z-}	2978.50	1985.33	1488.75	1190.80	992.17
[ds + 4 NH ₄ ⁺ + 5 / 6] ^{z-}	2905.04	1936.36	1452.02	1161.41	967.68
[ds + 4 NH ₄ ⁺ + 7 / 8] ^{z-}	2941.04	1960.36	1470.02	1175.81	979.68
[ds + 4 NH ₄ ⁺ + 11] ^{z-}	2885.57	1923.38	1442.29	1153.63	961.19
[ds + 4 NH ₄ ⁺ + 13] ^{z-}	2903.57	1935.38	1451.29	1160.83	967.19
[ts + 4 NH ₄ ⁺ + 2] ^{z-}	4174.22	2782.48	2086.61	1669.09	1390.74
[ts + 4 NH ₄ ⁺ + 3] ^{z-}	4226.22	2817.15	2112.61	1689.89	1408.07
[ts + 4 NH ₄ ⁺ + 5 / 6] ^{z-}	4152.76	2768.17	2075.88	1660.50	1383.59
[ts + 4 NH ₄ ⁺ + 7 / 8] ^{z-}	4188.76	2792.17	2093.88	1674.90	1395.59
[ts + 4 NH ₄ ⁺ + 11] ^{z-}	4133.29	2755.19	2066.15	1652.72	1377.10
[ts + 4 NH ₄ ⁺ + 13] ^{z-}	4151.29	2767.19	2075.15	1659.92	1383.10
[qs + 4 NH ₄ ⁺ + 2] ^{z-}	5421.94	3614.29	2710.47	2168.18	1806.65
[qs + 4 NH ₄ ⁺ + 3] ^{z-}	5473.94	3648.96	2736.47	2188.98	1823.98
[qs + 4 NH ₄ ⁺ + 5 / 6] ^{z-}	5400.48	3599.98	2699.74	2159.59	1799.49
[qs + 4 NH ₄ ⁺ + 7 / 8] ^{z-}	5436.48	3623.98	2717.74	2173.99	1811.49
[qs + 4 NH ₄ ⁺ + 11] ^{z-}	5381.01	3587.01	2690.01	2151.80	1793.00
[qs + 4 NH ₄ ⁺ + 13] ^{z-}	5399.01	3599.01	2699.01	2159.00	1799.00

Q2 - iões na presença de porfirinas e ausência de iões NH₄⁺ - porfirinas 1, 4, 9 e 14

carga (z)	-2	-3	-4	-5	-6
	Razão massa / carga (m/z)				
[ss + 1] ^{z-}	1561.35	1040.57	780.18	623.94	519.78
[ss + 4] ^{z-}	1568.86	1045.57	783.93	626.94	522.29
[ss + 9] ^{z-}	1576.37	1050.58	787.69	629.95	524.79
[ss + 14] ^{z-}	1583.88	1055.59	791.44	632.95	527.29
[ds + 1] ^{z-}	2809.07	1872.38	1404.04	1123.03	935.69
[ds + 4] ^{z-}	2808.57	1872.05	1403.79	1122.83	935.52
[ds + 9] ^{z-}	2808.07	1871.71	1403.54	1122.63	935.36
[ds + 14] ^{z-}	2807.57	1871.38	1403.29	1122.43	935.19
[ts + 1] ^{z-}	4056.79	2704.19	2027.90	1622.12	1351.60
[ts + 4] ^{z-}	4064.30	2709.20	2031.65	1625.12	1354.10
[ts + 9] ^{z-}	4071.81	2714.21	2035.41	1628.12	1356.60
[ts + 14] ^{z-}	4079.32	2719.21	2039.16	1631.13	1359.11
[qs + 1] ^{z-}	5304.51	3536.01	2651.76	2121.20	1767.50
[qs + 4] ^{z-}	5312.02	3541.01	2655.51	2124.21	1770.01
[qs + 9] ^{z-}	5319.53	3546.02	2659.27	2127.21	1772.51
[qs + 14] ^{z-}	5327.04	3551.03	2663.02	2130.22	1775.01

Q2 - iões na presença de porfirinas e ausência de iões NH₄⁺ - porfirinas 14 a 19

carga (n)	-2	-3	-4	-5	-6
	Razão massa / carga (m/z)				
[ss + 14] ^{z-}	1583.88	1055.59	791.44	632.95	527.29
[ss + 15] ^{z-}	1611.91	1074.27	805.46	644.16	536.64
[ss + 16] ^{z-}	1696.01	1130.34	847.50	677.80	564.67
[ss + 17] ^{z-}	1892.23	1261.15	945.61	756.29	630.08
[ss + 18] ^{z-}	1667.98	1111.65	833.49	666.59	555.33
[ss + 19] ^{z-}	1553.88	1035.59	776.44	620.95	517.29
[ds + 14] ^{z-}	2833.60	1888.73	1416.30	1132.84	943.87
[ds + 15] ^{z-}	2861.63	1907.42	1430.32	1144.05	953.21
[ds + 16] ^{z-}	2945.73	1963.48	1472.36	1177.69	981.24
[ds + 17] ^{z-}	3141.95	2094.30	1570.47	1256.18	1046.65
[ds + 18] ^{z-}	2917.70	1944.80	1458.35	1166.48	971.90
[ds + 19] ^{z-}	2800.07	1866.38	1399.54	1119.43	932.69
[ts + 14] ^{z-}	4081.32	2720.55	2040.16	1631.93	1359.77
[ts + 15] ^{z-}	4109.35	2739.23	2054.18	1643.14	1369.12
[ts + 16] ^{z-}	4193.45	2795.30	2096.22	1676.78	1397.15
[ts + 17] ^{z-}	4389.67	2926.11	2194.33	1755.27	1462.56
[ts + 18] ^{z-}	4165.42	2776.61	2082.21	1665.57	1387.81
[ts + 19] ^{z-}	4049.32	2699.21	2024.16	1619.13	1349.11
[qs + 14] ^{z-}	5327.04	3551.03	2663.02	2130.22	1775.01
[qs + 15] ^{z-}	5355.07	3569.71	2677.04	2141.43	1784.36
[qs + 16] ^{z-}	5439.17	3625.78	2719.08	2175.07	1812.39
[qs + 17] ^{z-}	5635.39	3756.59	2817.19	2253.55	1877.80
[qs + 18] ^{z-}	5411.14	3607.09	2705.07	2163.85	1803.05
[qs + 19] ^{z-}	5297.04	3531.03	2648.02	2118.22	1765.01

Q2 - iões na presença de porfirinas e ausência de iões NH₄⁺ - porfirinas 2, 3, 5 a 8, 11 e 13

carga (n)	-2	-3	-4	-5	-6
	Razão massa / carga (m/z)				
[ss + 2] ^{z-}	1644.28	1095.85	821.64	657.11	547.43
[ss + 3] ^{z-}	1696.28	1130.52	847.64	677.91	564.76
[ss + 5 / 6] ^{z-}	1622.82	1081.54	810.91	648.53	540.27
[ss + 7 / 8] ^{z-}	1658.82	1105.54	828.91	662.93	552.27
[ss + 11] ^{z-}	1603.35	1068.57	801.18	640.74	533.78
[ss + 13] ^{z-}	1621.35	1080.57	810.18	647.94	539.78
[ds + 2] ^{z-}	2892.50	1928.00	1445.75	1156.40	963.50
[ds + 3] ^{z-}	2944.50	1962.67	1471.75	1177.20	980.83
[ds + 5 / 6] ^{z-}	2871.54	1914.02	1435.27	1148.01	956.51
[ds + 7 / 8] ^{z-}	2907.54	1938.02	1453.27	1162.41	968.51
[ds + 11] ^{z-}	2852.57	1901.38	1425.79	1140.43	950.19
[ds + 13] ^{z-}	2870.57	1913.38	1434.79	1147.63	956.19
[ts + 2] ^{z-}	4140.22	2759.81	2069.61	1655.49	1379.41
[ts + 3] ^{z-}	4192.22	2794.48	2095.61	1676.29	1396.74
[ts + 5 / 6] ^{z-}	4119.26	2745.84	2059.13	1647.10	1372.42
[ts + 7 / 8] ^{z-}	4155.26	2769.84	2077.13	1661.50	1384.42
[ts + 11] ^{z-}	4100.29	2733.19	2049.65	1639.52	1366.10
[ts + 13] ^{z-}	4118.29	2745.19	2058.65	1646.72	1372.10
[qs + 2] ^{z-}	5387.44	3591.29	2693.22	2154.38	1795.15
[qs + 3] ^{z-}	5439.44	3625.96	2719.22	2175.18	1812.48
[qs + 5 / 6] ^{z-}	5365.98	3576.98	2682.49	2145.79	1787.99
[qs + 7 / 8] ^{z-}	5401.98	3600.98	2700.49	2160.19	1799.99
[qs + 11] ^{z-}	5346.51	3564.01	2672.76	2138.00	1781.50
[qs + 13] ^{z-}	5364.51	3576.01	2681.76	2145.20	1787.50

ANEXO 5.

*TABELAS UTILIZADAS PARA PREVISÃO DE
POSSÍVEIS IÕES PARA O G-QUADRUPLEX T_2AG_3*

T_2AG_3 - iões na ausência de porfirinas

ss(T ₂ AG ₃)	1846.12	—————→	C ₆₀ H ₇₅ N ₂₄ O ₃₅ P ₅			
ds(T ₂ AG ₃)	3692.24		C ₁₂₀ H ₁₅₀ N ₄₈ O ₇₀ P ₁₀			
ts(T ₂ AG ₃)	5538.36		C ₁₈₀ H ₂₂₅ N ₇₂ O ₁₀₅ P ₁₅			
qs(T ₂ AG ₃)	7384.48		C ₂₄₀ H ₃₀₀ N ₉₆ O ₁₄₀ P ₂₀			
Razão massa / carga (m/z)						
[ss (T ₂ AG ₃)] ^{z-}	922.06	614.37	460.53	368.22	306.69	262.73
[ds (T ₂ AG ₃)] ^{z-}	1845.12	1229.75	922.06	737.45	614.37	526.46
[ts (T ₂ AG ₃)] ^{z-}	2768.18	1845.12	1383.59	1106.67	922.06	790.19
[qs (T ₂ AG ₃)] ^{z-}	3691.24	2460.49	1845.12	1475.89	1229.75	1053.92
carga (z)	-2	-3	-4	-5	-6	-7
[qs (T ₂ AG ₃) + NH ₄ ⁺] ^{z-}	3700.24	2466.49	1849.62	1479.49	1232.75	1056.49
[qs (T ₂ AG ₃) + 2 NH ₄ ⁺] ^{z-}	3709.24	2472.49	1854.12	1483.09	1235.75	1059.07

Cadeia simples - **ss**

Cadeia tripla - **ts**

Cadeia dupla - **ds**

Quadruplex - **qs**

Nas tabelas apresentadas a carga negativa global (z) é o resultado do balanço entre as cargas negativas devidas à desprotonação e as cargas positivas (iões amónio e/ou porfirinas).

Nestas tabelas, ao contrário do que foi feito no capítulo 5, foram omitidos os prótons perdidos, no entanto o cálculo das razões massa / carga foi feito entrando em conta com esse factor.

**T₂AG₃ - iões na presença de porfirinas e de iões NH₄⁺ -
porfirina 1, 4, 9 e 14**

carga (z)	-2	-3	-4	-5	-6
	Razão massa / carga (m/z)				
[ss + 2 NH ₄ ⁺ + 1] ^{z-}	1254.69	836.13	626.85	501.28	417.56
[ss + 2 NH ₄ ⁺ + 4] ^{z-}	1262.20	841.13	630.60	504.28	420.07
[ss + 2 NH ₄ ⁺ + 9] ^{z-}	1269.71	846.14	634.36	507.28	422.57
[ss + 2 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	1277.22	851.15	638.11	510.29	425.07
[ds + 2 NH ₄ ⁺ + 1] ^{z-}	2177.75	1451.50	1088.38	870.50	725.25
[ds + 2 NH ₄ ⁺ + 4] ^{z-}	2177.25	1451.17	1088.13	870.30	725.08
[ds + 2 NH ₄ ⁺ + 9] ^{z-}	2176.75	1450.83	1087.88	870.10	724.92
[ds + 2 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	2176.25	1450.50	1087.63	869.90	724.75
[ts + 2 NH ₄ ⁺ + 1] ^{z-}	3100.81	2066.87	1549.91	1239.72	1032.94
[ts + 2 NH ₄ ⁺ + 4] ^{z-}	3108.32	2071.88	1553.66	1242.73	1035.44
[ts + 2 NH ₄ ⁺ + 9] ^{z-}	3115.83	2076.89	1557.42	1245.73	1037.94
[ts + 2 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	3123.34	2081.89	1561.17	1248.74	1040.45
[qs + 2 NH ₄ ⁺ + 1] ^{z-}	4023.87	2682.25	2011.44	1608.95	1340.62
[qs + 2 NH ₄ ⁺ + 4] ^{z-}	4031.38	2687.25	2015.19	1611.95	1343.13
[qs + 2 NH ₄ ⁺ + 9] ^{z-}	4038.89	2692.26	2018.95	1614.96	1345.63
[qs + 2 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	4046.40	2697.27	2022.70	1617.96	1348.13

**T₂AG₃ - iões na presença de porfirinas e de iões NH₄⁺ -
porfirinas 14 a 19**

carga (z)	-2	-3	-4	-5	-6
	Razão massa / carga (m/z)				
[ss + 2 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	1284.72	856.15	641.86	513.29	427.57
[ss + 2 NH ₄ ⁺ + 15] ^{z-}	1312.75	874.83	655.88	524.50	436.92
[ss + 2 NH ₄ ⁺ + 16] ^{z-}	1396.85	930.90	697.92	558.14	464.95
[ss + 2 NH ₄ ⁺ + 17] ^{z-}	1593.07	1061.71	796.03	636.63	530.36
[ss + 2 NH ₄ ⁺ + 18] ^{z-}	1368.82	912.21	683.91	546.93	455.61
[ss + 2 NH ₄ ⁺ + 19] ^{z-}	1248.72	832.15	623.86	498.89	415.57
[ds + 2 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	2207.78	1471.52	1103.39	882.51	735.26
[ds + 2 NH ₄ ⁺ + 15] ^{z-}	2235.81	1490.21	1117.41	893.72	744.60
[ds + 2 NH ₄ ⁺ + 16] ^{z-}	2319.91	1546.27	1159.45	927.36	772.64
[ds + 2 NH ₄ ⁺ + 17] ^{z-}	2516.13	1677.08	1257.56	1005.85	838.04
[ds + 2 NH ₄ ⁺ + 18] ^{z-}	2291.88	1527.58	1145.44	916.15	763.29
[ds + 2 NH ₄ ⁺ + 19] ^{z-}	2170.25	1446.50	1084.63	867.50	722.75
[ts + 2 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	3121.84	2080.89	1560.42	1248.14	1039.95
[ts + 2 NH ₄ ⁺ + 15] ^{z-}	3149.87	2099.58	1574.44	1259.35	1049.29
[ts + 2 NH ₄ ⁺ + 16] ^{z-}	3233.97	2155.64	1616.48	1292.99	1077.32
[ts + 2 NH ₄ ⁺ + 17] ^{z-}	3430.19	2286.46	1714.59	1371.47	1142.73
[ts + 2 NH ₄ ⁺ + 18] ^{z-}	3205.94	2136.96	1602.47	1281.77	1067.98
[ts + 2 NH ₄ ⁺ + 19] ^{z-}	3094.84	2062.89	1546.92	1237.34	1030.95
[qs + 2 NH ₄ ⁺ + 14] ^{z-}	4044.90	2696.27	2021.95	1617.36	1347.63
[qs + 2 NH ₄ ⁺ + 15] ^{z-}	4072.93	2714.95	2035.97	1628.57	1356.98
[qs + 2 NH ₄ ⁺ + 16] ^{z-}	4157.03	2771.02	2078.01	1662.21	1385.01
[qs + 2 NH ₄ ⁺ + 17] ^{z-}	4353.25	2901.83	2176.12	1740.70	1450.42
[qs + 2 NH ₄ ⁺ + 18] ^{z-}	4129.00	2752.33	2064.00	1651.00	1375.67
[qs + 2 NH ₄ ⁺ + 19] ^{z-}	4017.90	2678.27	2008.45	1606.56	1338.63

**T₂AG₃ - iões na presença de porfirinas e de iões NH₄⁺ -
porfirinas 2, 3, 5 a 8, 11 e 13**

carga (z)	-2	-3	-4	-5	-6
	Razão massa / carga (m/z)				
[ss + 2 NH ₄ ⁺ + 2] ^{z-}	1336.12	890.41	667.56	533.85	444.71
[ss + 2 NH ₄ ⁺ + 3] ^{z-}	1397.12	931.08	698.06	558.25	465.04
[ss + 2 NH ₄ ⁺ + 5 / 6] ^{z-}	1314.66	876.10	656.83	525.26	437.55
[ss + 2 NH ₄ ⁺ + 7 / 8] ^{z-}	1359.66	906.10	679.33	543.26	452.55
[ss + 2 NH ₄ ⁺ + 11] ^{z-}	1295.19	863.13	647.10	517.48	431.06
[ss + 2 NH ₄ ⁺ + 13] ^{z-}	1322.19	881.13	660.60	528.28	440.06
[ds + 2 NH ₄ ⁺ + 2] ^{z-}	2259.18	1505.79	1129.09	903.07	752.39
[ds + 2 NH ₄ ⁺ + 3] ^{z-}	2320.18	1546.45	1159.59	927.47	772.73
[ds + 2 NH ₄ ⁺ + 5 / 6] ^{z-}	2237.72	1491.48	1118.36	894.49	745.24
[ds + 2 NH ₄ ⁺ + 7 / 8] ^{z-}	2282.72	1521.48	1140.86	912.49	760.24
[ds + 2 NH ₄ ⁺ + 11] ^{z-}	2227.25	1484.50	1113.13	890.30	741.75
[ds + 2 NH ₄ ⁺ + 13] ^{z-}	2245.25	1496.50	1122.13	897.50	747.75
[ts + 2 NH ₄ ⁺ + 2] ^{z-}	3182.24	2121.16	1590.62	1272.30	1060.08
[ts + 2 NH ₄ ⁺ + 3] ^{z-}	3234.24	2155.83	1616.62	1293.10	1077.41
[ts + 2 NH ₄ ⁺ + 5 / 6] ^{z-}	3160.78	2106.85	1579.89	1263.71	1052.93
[ts + 2 NH ₄ ⁺ + 7 / 8] ^{z-}	3196.78	2130.85	1597.89	1278.11	1064.93
[ts + 2 NH ₄ ⁺ + 11] ^{z-}	3141.31	2093.87	1570.16	1255.92	1046.44
[ts + 2 NH ₄ ⁺ + 13] ^{z-}	3159.31	2105.87	1579.16	1263.12	1052.44
[qs + 2 NH ₄ ⁺ + 2] ^{z-}	4105.30	2736.53	2052.15	1641.52	1367.77
[qs + 2 NH ₄ ⁺ + 3] ^{z-}	4157.30	2771.20	2078.15	1662.32	1385.10
[qs + 2 NH ₄ ⁺ + 5 / 6] ^{z-}	4083.84	2722.22	2041.42	1632.93	1360.61
[qs + 2 NH ₄ ⁺ + 7 / 8] ^{z-}	4119.84	2746.22	2059.42	1647.33	1372.61
[qs + 2 NH ₄ ⁺ + 11] ^{z-}	4064.37	2709.25	2031.69	1625.15	1354.12
[qs + 2 NH ₄ ⁺ + 13] ^{z-}	4082.37	2721.25	2040.69	1632.35	1360.12

T_2AG_3 - iões na presença de porfirinas e ausência de iões NH_4^+ - porfirinas 1, 4, 9 e 14

carga (z)	-2	-3	-4	-5	-6
	Razão massa / carga (m/z)				
$[ss + 1]^{z-}$	1236.69	824.13	617.85	494.08	411.56
$[ss + 4]^{z-}$	1244.20	829.13	621.60	497.08	414.07
$[ss + 9]^{z-}$	1251.71	834.14	625.36	500.08	416.57
$[ss + 14]^{z-}$	1259.22	839.15	629.11	503.09	419.07
$[ds + 1]^{z-}$	2159.75	1439.50	1079.38	863.30	719.25
$[ds + 4]^{z-}$	2159.25	1439.17	1079.13	863.10	719.08
$[ds + 9]^{z-}$	2158.75	1438.83	1078.88	862.90	718.92
$[ds + 14]^{z-}$	2158.25	1438.50	1078.63	862.70	718.75
$[ts + 1]^{z-}$	3082.81	2054.87	1540.91	1232.52	1026.94
$[ts + 4]^{z-}$	3090.32	2059.88	1544.66	1235.53	1029.44
$[ts + 9]^{z-}$	3097.83	2064.89	1548.42	1238.53	1031.94
$[ts + 14]^{z-}$	3105.34	2069.89	1552.17	1241.54	1034.45
$[qs + 1]^{z-}$	4005.87	2670.25	2002.44	1601.75	1334.62
$[qs + 3]^{z-}$	4013.38	2675.25	2006.19	1604.75	1337.13
$[qs + 9]^{z-}$	4020.89	2680.26	2009.95	1607.76	1339.63
$[qs + 14]^{z-}$	4028.40	2685.27	2013.70	1610.76	1342.13

T₂AG₃ - íões na presença de porfirinas e ausência de íões NH₄⁺ - porfirinas 14 a 19

carga (z)	-2	-3	-4	-5	-6
	Razão massa / carga (m/z)				
[ss + 14] ^{z-}	1259.22	839.15	629.11	503.09	419.07
[ss + 15] ^{z-}	1287.25	857.83	643.13	514.30	428.42
[ss + 16] ^{z-}	1371.35	913.90	685.17	547.94	456.45
[ss + 17] ^{z-}	1567.57	1044.71	783.28	626.43	521.86
[ss + 18] ^{z-}	1343.32	895.21	671.16	536.73	447.11
[ss + 19] ^{z-}	1230.72	820.15	614.86	491.69	409.57
[ds + 14] ^{z-}	2182.28	1455.85	1091.64	873.11	727.43
[ds + 15] ^{z-}	2210.31	1474.54	1105.66	884.32	736.77
[ds + 16] ^{z-}	2294.41	1530.60	1147.70	917.96	764.80
[ds + 17] ^{z-}	2490.63	1661.42	1245.81	996.45	830.21
[ds + 18] ^{z-}	2268.38	1511.92	1133.69	906.75	755.46
[ds + 19] ^{z-}	2152.25	1434.50	1075.63	860.30	716.75
[ts + 14] ^{z-}	3105.34	2071.23	1553.17	1242.34	1035.11
[ts + 15] ^{z-}	3133.37	2089.91	1567.19	1253.55	1044.46
[ts + 16] ^{z-}	3217.47	2145.98	1609.23	1287.19	1072.49
[ts + 17] ^{z-}	3413.69	2276.79	1707.34	1365.67	1137.90
[ts + 18] ^{z-}	3191.44	2127.29	1595.22	1275.97	1063.15
[ts + 19] ^{z-}	3076.84	2050.89	1537.92	1230.14	1024.95
[qs + 14] ^{z-}	4028.40	2685.27	2013.70	1610.76	1342.13
[qs + 15] ^{z-}	4056.43	2703.95	2027.72	1621.97	1351.48
[qs + 16] ^{z-}	4140.53	2760.02	2069.76	1655.61	1379.51
[qs + 17] ^{z-}	4336.75	2890.83	2167.87	1734.10	1444.92
[qs + 18] ^{z-}	4112.50	2741.33	2055.75	1644.40	1370.17
[qs + 19] ^{z-}	3999.90	2666.27	1999.45	1599.36	1332.63

T₂AG₃ - iões na presença de porfirinas e ausência de iões NH₄⁺ - porfirinas 2, 3, 5 a 8, 11 e 13

carga (z)	-2	-3	-4	-5	-6
	Razão massa / carga (m/z)				
[ss + 2] ^{z-}	1319.62	879.41	659.31	527.25	439.21
[ss + 3] ^{z-}	1370.12	913.08	684.56	547.45	456.04
[ss + 5 / 6] ^{z-}	1298.16	865.10	648.58	518.66	432.05
[ss + 7 / 8] ^{z-}	1333.16	888.44	666.08	532.66	443.72
[ss + 11] ^{z-}	1278.69	852.13	638.85	510.88	425.56
[ss + 13] ^{z-}	1296.19	863.79	647.60	517.88	431.40
[ds + 2] ^{z-}	2243.18	1495.12	1121.09	896.67	747.06
[ds + 3] ^{z-}	2295.18	1529.79	1147.09	917.47	764.39
[ds + 5 / 6] ^{z-}	2222.22	1481.14	1110.61	888.29	740.07
[ds + 7 / 8] ^{z-}	2258.22	1505.14	1128.61	902.69	752.07
[ds + 11] ^{z-}	2203.25	1468.50	1101.13	880.70	733.75
[ds + 13] ^{z-}	2221.25	1480.50	1110.13	887.90	739.75
[ts + 2] ^{z-}	3166.24	2110.49	1582.62	1265.90	1054.75
[ts + 3] ^{z-}	3218.24	2145.16	1608.62	1286.70	1072.08
[ts + 5 / 6] ^{z-}	3145.28	2096.52	1572.14	1257.51	1047.76
[ts + 7 / 8] ^{z-}	3181.28	2120.52	1590.14	1271.91	1059.76
[ts + 11] ^{z-}	3126.31	2082.87	1562.66	1249.92	1041.44
[ts + 13] ^{z-}	3144.31	2095.87	1571.66	1257.12	1047.44
[qs + 2] ^{z-}	4088.80	2725.53	2043.90	1634.92	1362.27
[qs + 3] ^{z-}	4139.30	2759.20	2069.15	1655.12	1379.10
[qs + 5 / 6] ^{z-}	4067.34	2711.22	2033.17	1626.33	1355.11
[qs + 7 / 8] ^{z-}	4102.34	2734.56	2050.67	1640.33	1366.78
[qs + 11] ^{z-}	4047.87	2698.25	2023.44	1618.55	1348.62
[qs + 13] ^{z-}	4065.37	2709.91	2032.19	1625.55	1354.46

ANEXO 6.

TABELAS UTILIZADAS PARA PREVISÃO DE POSSÍVEIS IÕES PARA O G-QUADRUPLEX $T_4G_4T_4$

T₄G₄T₄ - iões na ausência de porfirinas

ss(T ₄ G ₄ T ₄)	3686.62	————→	C ₁₂₀ H ₁₅₃ N ₃₆ O ₇₈ P ₁₁			
ds(T ₄ G ₄ T ₄)	7373.24		C ₂₄₀ H ₃₀₆ N ₇₂ O ₁₅₆ P ₂₂			
ts(T ₄ G ₄ T ₄)	11059.86		C ₃₆₀ H ₄₅₉ N ₁₀₈ O ₂₃₄ P ₃₃			
qs(T ₄ G ₄ T ₄)	14746.48		C ₄₈₀ H ₆₁₂ N ₁₄₄ O ₃₁₂ P ₄₄			
Razão massa / carga (m/z)						
[ss (T ₄ G ₄ T ₄)] ^{z-}	1842.31	1227.87	920.65	736.32	613.46	525.66
[ds (T ₄ G ₄ T ₄)] ^{z-}	3685.62	2456.75	1842.31	1473.65	1227.87	1052.32
[ts (T ₄ G ₄ T ₄)] ^{z-}	5528.93	3685.62	2763.96	2210.97	1842.31	1578.98
[qs (T ₄ G ₄ T ₄)] ^{z-}	7372.24	4914.49	3685.62	2948.29	2456.75	2105.64
carga (z)	2	3	4	5	6	7
[qs + NH ₄] ^{z-}	7381.24	4920.49	3690.12	2951.90	2459.75	2108.21
[qs + 2 NH ₄] ^{z-}	7390.24	4926.49	3694.62	2955.49	2462.75	2110.78
[qs + 3 NH ₄] ^{z-}	7399.24	4932.49	3699.12	2959.10	2465.75	2113.35

Cadeia simples - **ss**

Cadeia tripla - **ts**

Cadeia dupla - **ds**

Quadruplex – **qs**

Nas tabelas apresentadas a carga negativa global (z) é o resultado do balanço entre as cargas negativas devidas à desprotonação e as cargas positivas (iões amónio e/ou porfirinas).

Nestas tabelas, ao contrário do que foi feito no capítulo 5, foram omitidos os protões perdidos, no entanto o cálculo das razões mass / carga foi feito entrando em conta com esse factor.